

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudos Fitoquímico e Biológico de
Pachystroma longifolium (Nees) I. M. Johnst
(Euphorbiaceae)**

Dayane de Cássia Galvão

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2013**

Dayane de Cássia Galvão

**Estudos Fitoquímico e Biológico de
Pachystroma longifolium (Nees) I. M. Johnst
(Euphorbiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza
Borges

**VITÓRIA
2013**

Estudos Fitoquímico e Biológico de
Pachystroma longifolium (Nees) I. M. Johnst
(Euphorbiaceae)

Dayane de Cássia Galvão

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Química.

Aprovada em /2013 por:

Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 29 de agosto de 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G182e Galvão, Dayane de Cássia, 1988-
Estudos fitoquímico e biológico de *Pachystroma longifolium*
(Nees) I. M. Johnst (Euphorbiaceae) / Dayane de Cássia Galvão.
– 2013.
97 f. : il.

Orientador: Warley de Souza Borges.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Produtos naturais. 2. Euforbiaceae. 3. Fitoquímicos. 4.
Câncer. I. Borges, Warley de Souza. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Dedico este trabalho aos meus pais João Galvão Sobrinho e Ivane Aparecida de Souza Galvão e ao meu marido Ronney de Paula da Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar cada um de meus passos, acalmar meu coração e conceder-me força. Mesmo em períodos de desesperança ou ausência de fé, Ele sempre se fez presente, demonstrando o valor e a beleza de viver e de lutar pela felicidade. Tenho certeza que Ele colocou, no meu caminho, as pessoas certas no momento certo.

Aos meus pais, João e Ivane, que muito me ensinaram e são os principais responsáveis pelos valores que hoje ostento. Obrigada pelo apoio incondicional e por fornecerem as bases que só uma família de verdade é capaz de proporcionar. Por vocês, tenho um grande amor e respeito! Deixo um agradecimento adicional a minha mãe que acompanhou e auxiliou, diretamente, a minha rotina acadêmica.

Ao meu companheiro Ronney, pelo amor, carinho, suporte e amadurecimento. Tantos anos juntos e tantas situações vividas... Tudo nos tornou mais próximos e mais amigos. Sendo que hoje, podemos verdadeiramente dizer que almejamos os mesmos sonhos e lutamos para manter uma felicidade mais do que especial: a nossa. Amo você!

Ao meu irmão Oswander e todo o restante da família, que, de alguma forma, contribuíram na minha caminhada.

Aos meus amigos Eder Lana e Leandra Gobira, sempre disponíveis a ajudar, tanto na vida pessoal como nos estudos. Obrigada pelos momentos de distração, alegria e de conversas, e também pelo suporte e pela força em todos os dias de trabalho cumprido. Que a amizade se fortaleça cada vez mais e que Deus siga abençoando vocês.

Ao meu orientador Prof.Dr. Warley de Souza Borges, pessoa obstinada na realização de suas metas. Obrigada pela oportunidade oferecida e pelos ensinamentos.

Aos demais amigos da Fitoquímica: Thales Altoé, Marlise Rizzo, Olívia Kretli, Gabriela Tavares e Amanda Guilherme. Sou grata por todo o auxílio nos experimentos do laboratório. Um agradecimento especial à amiga Caroline Guerrieri

que, além do apoio fornecido durante sua iniciação científica, demonstrou ser uma pessoa alegre e de confiança.

Aos professores da Farmácia-Bioquímica e, principalmente, do Ensino Médio, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas do curso de Farmácia-Bioquímica, pelos bons momentos vividos.

Aos amigos de infância e adolescência, que apesar de estarem longe, guardo no coração.

Aos amigos que conheci pela internet e moram em outros Estados.

Aos alunos Wanderson Keijok e Weverson Cavalcante, pelos auxílios durante o Mestrado.

Ao laboratório de Cromatografia Gasosa. Agradeço, principalmente, ao Artur Rodrigues, pela disponibilidade e simpatia de sempre.

Aos laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas, pelas análises realizadas.

Ao doutorando Emerson Finco Marques e à Central Analítica da Universidade de São Paulo, pelas análises de Espectrometria de Massas.

À professora Luciana Diaz Thomas, pelo auxílio na identificação da espécie da planta trabalhada.

Aos colaboradores do Projeto Sisbiota, principalmente o Prof.Dr. Paulo Cezar Vieira.

Aos professores Geisamanda Athayde e James Almada, pela disponibilidade em participar da banca.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”
(Charles Chaplin)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas das moléculas de morfina (I), fisiostigmina (II), vincristina (III) e vimblastina (IV).	20
Figura 2. Estruturas químicas das moléculas de paclitaxel (V), camptotecina (VI), podofilotoxina (VII) e <i>trans</i> -DCTN (VIII).	29
Figura 3. Frações a partir do extrato bruto (W9F) e fracionamento cromatográfico inicial da fração W9FA.	35
Figura 4. Fracionamento cromatográfico para as frações W9FA2, W9FA3, W9FA4, W9FA8 e W9FA9. *Condições cromatográficas para CLV iguais àquelas apresentadas na Figura 3. **Condições para CLAE descritas na página 32.	38
Figura 5. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA5. *Condições para CLAE descritas na página 32.	39
Figura 6. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA6. *Condições para CLAE descritas na página 32.	40
Figura 7. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA7. *Condições para CLAE descritas na página 32.	41
Figura 8. Fracionamento cromatográfico inicial para a fração W9FH. *Condições cromatográficas para CLV iguais àquelas apresentadas na Figura 3.	42
Figura 9. Fracionamento cromatográfico para as frações W9FH2/3 e W9FH6. *Condições cromatográficas para CLV iguais àquelas apresentadas na Figura 3. ...	44
Figura 10. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FH5.	45
Figura 11. Esquema geral do ensaio enzimático de inibição de catepsinas. Fonte: SEVERINO, 2008 (modificado).	46
Figura 12. Ensaios de inibição de catepsinas K, L e V, respectivamente.	49
Figura 13. Estrutura química geral de um ftalato.	50
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H destacando sinais de ftalato (CDCl_3 , 400 MHz).	51
Figura 15. Estrutura química da clorofila tipo “a”.	52
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H destacando sinais de clorofila e de ftalato (acetona- D_6 , 400 MHz).	53
Figura 17. Cromatograma analítico de fase reversa (225 nm) demonstrando as bandas correspondentes à clorofila e ftalatos.	54

Figura 18. Espectro na região do UV dos derivados de clorofila.	55
Figura 19. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (225 nm) para a subfração W9FA4.4.	57
Figura 20. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (267 nm) para a subfração W9FA5.7(4,5).	57
Figura 21. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (218 nm) para a subfração W9FA5.7(4,5).	58
Figura 22. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (331 nm) para a subfração W9FA6.2.3.	58
Figura 23. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (225 nm) para a subfração W9FA7.4.	59
Figura 24. Estrutura química da loliolida (1).	63
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H da loliolida (CDCl_3 , 400 MHz).	65
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C da loliolida (CDCl_3 , 100 MHz).	66
Figura 27. Espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^-$ para a loliolida.	66
Figura 28. Estrutura química do ácido gálico (3).	67
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do ácido gálico (CD_3OD , 400 MHz).	68
Figura 30. Espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^-$ para o ácido gálico.	69
Figura 31. Estrutura química da pentagaloilglicose, exemplo de um galotanino.	69
Figura 32. Estrutura química do galato de etila (2).	70
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do galato de etila (CD_3OD , 400 MHz).	72
Figura 34. Espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^-$ para o galato de etila.	73
Figura 35. Estrutura química do protocatecuato de metila (4).	73
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do protocatecuato de metila (CD_3OD , 400 MHz).	74
Figura 37. Mapa de contornos HMBC da substância protocatecuato de metila (CD_3OD , 400 MHz).	75
Figura 38. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , e correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância protocatecuato de metila.	76
Figura 39. Espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^+$ para o protocatecuato de metila.	76
Figura 40. Estrutura química do ácido protocatecuico.	77
Figura 41. Estruturas do isopreno, DMAPP e IPP, respectivamente.	77
Figura 42. Estruturas químicas da α -amirina (5), β -amirina (6) e lupeol (7).	78
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H para α -amirina, β -amirina e lupeol em mistura	

(CDCl ₃ , 400 MHz).....	79
Figura 44. Cromatograma da subfração W9FH5.5.1 e espectros de massas da α-amirina, β-amirina e lupeol, respectivamente.	80
Figura 45. Cromatograma da subfração W9FH5.3.2 e espectro de massas da β-amirina.	81
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H para β-amirina (CDCl ₃ , 400 MHz).....	82
Figura 47. Estrutura química do sitosterol (8).....	83
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H para o sitosterol (CDCl ₃ , 400 MHz).	84
Figura 49. Cromatograma da subfração W9FH5.6.2 e espectro de massas do sitosterol.....	85
Figura 50. Estruturas químicas do estigmasterol (IX) e campesterol (X), respectivamente.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies da família Euphorbiaceae, alguns nomes populares e usos na medicina tradicional. FONTE: STASI e HIRUMA-LIMA, 2002.	24
Tabela 2. Algumas classes de substâncias químicas encontradas em Euphorbiaceae e suas indicações terapêuticas. Fonte: MWINE e VAN DAMME, 2011 (modificado).25	25
Tabela 3. Resultados para amostras da fração AcOEt.....	55
Tabela 4. Substâncias isoladas a partir da fração acetato de etila.	61
Tabela 5. Substâncias identificadas a partir da fração hexânica.....	62
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) obtidos para loliolida (1) e comparados com a literatura (*) (CONEGERO, IDE, NAZARI <i>et al</i> , 2002) (δ em ppm, J em Hz).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CD₃OD – Metanol deuterado
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CHCl₃ – Clorofórmio
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC – Cromatografia Líquida em Coluna
CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DMSO-D₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
DTE – Ditioeritritol
E-64 – L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EM – Espectrometria de Massas
Hex – Hexano
HMBC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*
HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
MeOH – Metanol
MTT - Metiltetrazolium
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
TMS – Tetrametilsilano
UV – Ultravioleta
Z-FR-MCA – Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

LISTA DE SÍMBOLOS

μg - Micrograma

μL - Microlitro

A – Absorbância

δ - Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

d – Dubleto

dd – Duplo dubleto

dt – Duplo tripleto

Hz – Hertz

L - Litro

J – Constante de acoplamento

m – Multiplete

nm - Nanômetro

quart – Quarteto

quint - Quintuplete

s – Singleto

t – Tripleto

RESUMO

Este trabalho descreve a investigação fitoquímica e também biológica de extratos provenientes das folhas de *Pachystroma longifolium*; espécie da família Euphorbiaceae que não apresenta esses estudos previamente publicados. O objetivo foi isolar e identificar metabólitos secundários dessa espécie e, adicionalmente, testar os extratos quanto à inibição de células tumorais e de catepsinas humanas. Substâncias isoladas também foram ensaiadas nesse último teste. Apesar do grande número de medicamentos que são lançados no mercado ao longo dos anos, muitos se tratam apenas de pequenas modificações químicas em moléculas já utilizadas como fármacos. Consequentemente, diversas doenças ainda têm uma terapêutica inefetiva e a necessidade de inovação existe. Os produtos naturais continuam sendo a fonte mais promissora para desenvolvimento de novos medicamentos, devido à complexidade e diversidade das substâncias, e ao grande potencial de uma biodiversidade ainda pouco explorada; visto que muitas espécies de plantas, por exemplo, ainda não foram estudadas, como era o caso de *P. longifolium* até o presente trabalho. A metodologia cromatográfica levou ao isolamento dos compostos loliolida (1), galato de etila (2), ácido gálico (3) e protocatecuato de metila (4); além da identificação em mistura de α -amirina (5), β -amirina (6), lupeol (7) e sitosterol (8). O extrato bruto, hexânico e acetato de etila das folhas foram ensaiados frente às catepsinas K, L e V, enquanto somente o extrato bruto foi testado para inibição de células tumorais. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos para inibição de catepsina V, para a qual todos os extratos apresentaram pelo menos 50% de inibição nas concentrações de 500, 250, 125, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Para o ensaio de citotoxicidade, o extrato bruto, na concentração de 1 mg/mL , foi considerado inativo. As quatro substâncias isoladas foram testadas frente às catepsinas K, L e V, contudo não apresentaram resultados positivos.

Palavras-chave: *Pachystroma longifolium*. Produtos Naturais. Euphorbiaceae. Catepsinas. Câncer.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical and biological investigations of extracts of leaves of *Pachystroma longifolium*; specie of the Euphorbiaceae family that doesn't present previously published these studies. The aim was to isolate and identify secondary metabolites of this specie and, farther, to test the extracts for inhibition of tumor cells and human cathepsins. Isolated substances were tested too. Despite the large number of drugs that come on the market over the years, many of them are only small rearrangements in chemical molecules already used as drugs. So, various diseases have still ineffective therapy and the need for innovation exists. Natural products continue to be the most promising source for new drug development, due to the complexity and diversity of substances, and the great potential of an unexplored biodiversity; since many species of plants, for example, have not been studied as the case of *P. longifolium* to the present work. The chromatographic method led to the isolation of compounds: loliolide (1), ethyl gallate (2), gallic acid (3) and protocatechuate methyl (4). Also α -amyrin (5) β -amyrin (6), lupeol (7) and sitosterol (8) were identified in the mixture. The crude, hexane and ethyl acetate extracts of leaves were tested against cathepsins K, L and V, while only the crude extract was tested for inhibition of tumor cells. The most satisfactory results were obtained for inhibition of cathepsin V, to which all of the extracts showed at least 50% of inhibition at concentrations of 500, 250, 125, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$. For the cytotoxicity assay, the crude extract, at concentration of 1 mg/mL , was considered inactive. Four isolated substances were tested against the cathepsins K, L and V, however did not show positive results.

Keywords: *Pachystroma longifolium*. Natural products. Euphorbiaceae. Cathepsins. Cancer.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Necessidade de novos fármacos e importância de produtos naturais	19
1.2	Biodiversidade, Mata Atlântica e conservação	22
1.3	Família Euphorbiaceae	23
1.3.1	<i>Pachystroma longifolium</i> (Nees) I. M. Johnst	25
1.4	Busca por atividades biológicas	26
1.4.1	Inibição de enzimas	26
1.4.2	Câncer	28
2.	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1	Materiais e instrumentação	31
3.1.1	Materiais para estudo químico.....	31
3.1.2	Materiais para ensaio de inibição de catepsinas	32
3.1.3	Materiais para ensaio de inibição de células tumorais.....	33
3.2	Obtenção do material vegetal	33
3.3	Obtenção dos extratos	33
3.4	Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila (W9FA)	34
3.5	Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (W9FH)	41
3.6	Ensaio de inibição de catepsinas	46
3.7	Ensaio de inibição de células tumorais	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Avaliação dos extratos quanto à inibição de catepsinas	48
4.2	Avaliação do extrato bruto quanto à inibição de células tumorais	50

4.3	Contaminação por ftalatos e presença de derivados de clorofila	50
4.4	Resultados para o fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (W9FA).....	55
4.5	Resultados para o fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (W9FH)	59
4.6	Substâncias identificadas e/ou isoladas.....	60
4.7	Determinação estrutural	63
4.7.1	Substância 1	63
4.7.2	Substâncias 2 e 3	67
4.7.3	Substância 4	73
4.7.4	Substâncias 5, 6 e 7	77
4.7.5	Substância 8	83
4.8	Avaliação das substâncias isoladas no teste de inibição de catepsinas	86
4.9	Considerações sobre o ensaio das substâncias isoladas frente a células tumorais	86
5.	CONCLUSÃO	87
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Necessidade de novos fármacos e importância de produtos naturais

Ao longo dos anos, avanços significativos na terapêutica aconteceram, todavia a carência por novos fármacos para combate de certas doenças persiste e pode ser exemplificada por citações de diversos autores. De acordo com DE PAUW (2000), “com o aumento do número de fungos patógenos e o crescente problema de resistência, novos agentes antifúngicos são requeridos”. COSTA-LOTUFO, MONTENEGRO, ALVES *et al* (2010) relatam que “a melhora no tratamento sistêmico de tumores mais frequentes em adultos (pulmão, mama, cólon, pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em índices altos de mortalidade”. Por fim, o problema da resistência bacteriana é abordado por LOUNIS, VEZIRIS e CHAUFFOR (2006): “No tratamento de tuberculose, [...] houve aumento na taxa de resistência aos fármacos atuais. Há necessidade de novos fármacos [...]”.

Um considerável número de medicamentos é lançado no mercado, contudo tem-se que mais de 70% correspondem a modificações químicas, feitas pelas indústrias farmacêuticas, em moléculas já utilizadas como fármacos; são os chamados medicamentos *me too* (FREITAS, 2009, QUEIROZ e VASCONCELOS, 2008). Frequentemente, eles não demonstram nenhum benefício significativo em relação aos agentes terapêuticos previamente utilizados (KISSIN, 2013, GAGNE e CHOUDHRY, 2011).

Sendo assim, a necessidade de inovação existe e, em tal situação, “a contribuição dos produtos naturais para o surgimento e desenvolvimento da farmacoterapia é inquestionável” (SOUZA, MELLO, LOPES, 2012). Na verdade, o uso de tais produtos com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana (RATES, 2001) e as plantas, especialmente, são a origem da descoberta de vários medicamentos.

Um exemplo clássico é a morfina (I) (Figura 1), extraída do ópio de *Papaver somniferum*, hoje utilizada como potente analgésico, mas que exhibe relatos desde 4.000 a.C. (HOSTETTMANN, QUEIROZ, VIEIRA, 2003). Em 1804, o farmacêutico Friedrich Serturmer isolou esse primeiro composto puro e farmacologicamente ativo,

sendo iniciada, então, a possibilidade de fármacos serem purificados a partir de plantas, estudados e administrados em dosagens precisas (LI e VEDERAS, 2009, BARREIRO e BOLZANI, 2009).

É o caso de várias outras substâncias utilizadas atualmente como fármacos importantes e de sucesso, a exemplo de: vincristina e vimblastina para tratamento de câncer e extraídas de *Catharantus roseus* (MA e WANG, 2009); e a fisostigmina, proveniente das sementes de *Phisostigma venenosus* e usada contra miastenia grave e glaucoma (Figura 1).

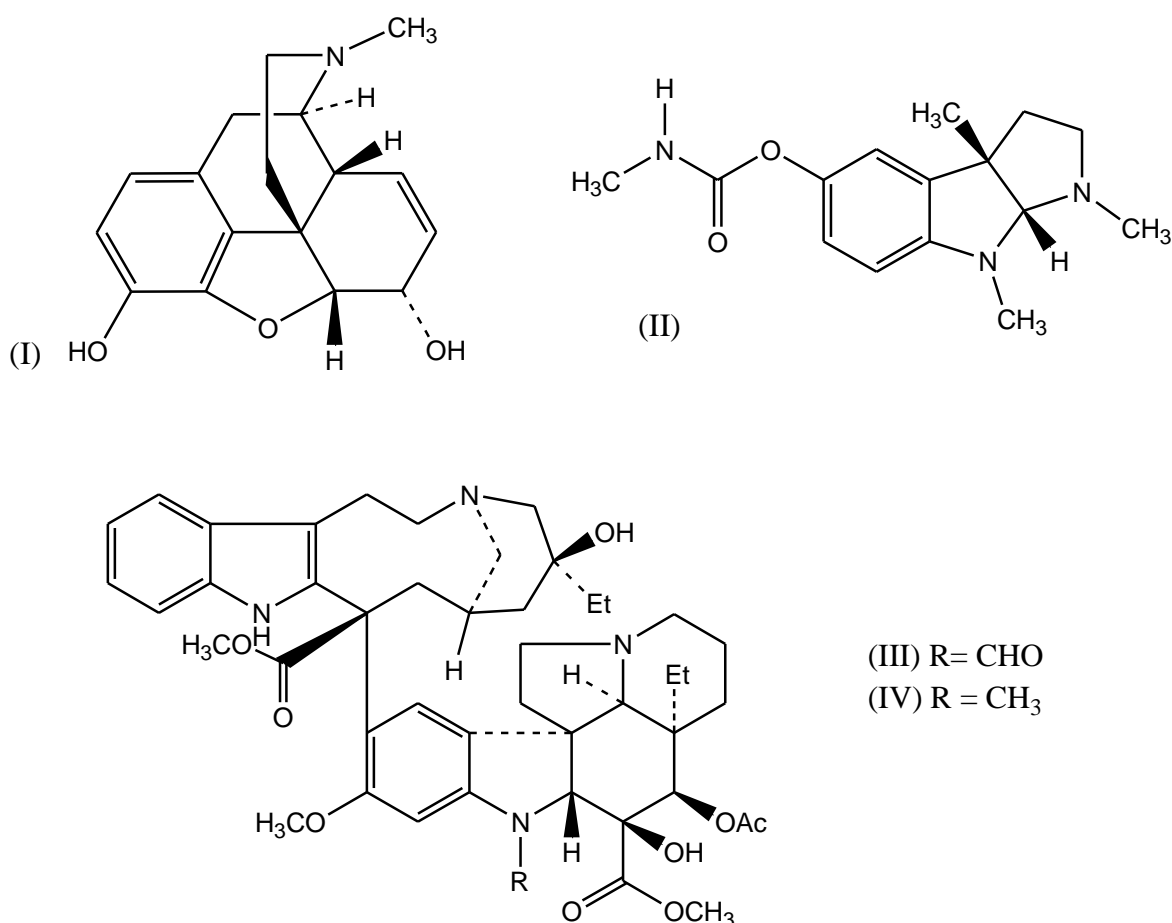


Figura 1. Estruturas químicas das moléculas de morfina (I), fisostigmina (II), vincristina (III) e vimblastina (IV).

Essas moléculas orgânicas, conhecidas como metabólitos secundários, diferentemente dos produtos do metabolismo primário (carboidratos, lipídios, proteínas), são ditas não fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da planta, entretanto contribuem para a manutenção da mesma, ao passo que estão envolvidas em processos de proteção contra herbívoros/predadores, bactérias e

fungos, também contra radiação ultravioleta e outras condições adversas; além de poderem atuar como agentes atratores de polinizadores para disseminação da espécie e inibirem o crescimento de plantas vizinhas as quais poderiam competir por nutrientes (FATORUSSO e TAGLIATELA-SCAFATI, 2008). Dessa forma, por desempenharem tantas funções distintas, os metabólitos secundários são interessantes fontes de fármacos.

Em termos de grandes indústrias farmacêuticas, houve certo decréscimo em pesquisa de produtos naturais, por volta das últimas duas décadas, devido a situações como a forte pressão existente para a descoberta rápida e rentável de novos fármacos. Entretanto, por todo o processo laborioso que exigem para isolamento, identificação e confirmação de atividade biológica, produtos de origem natural geralmente não se encaixam no primeiro quesito. A situação, porém, vem mudando devido aos inúmeros recursos naturais ainda inexplorados, aos novos métodos de triagem biológica, as tecnologias de biologia celular e também a automatização de técnicas de separação e análise estrutural. Tudo isso proporciona recursos, direciona e acelera as pesquisas, e, conseqüentemente, redesperta interesse dessas indústrias para a descoberta de novos produtos naturais (LI e VEDERAS, 2009, HARVEY, 2008, KOEHN e CARTER, 2005). Além disso, mesmo tendo gerado um bom retorno para as companhias farmacêuticas inicialmente, os medicamentos *me too* demonstraram queda nos lucros com o passar do tempo, revelando que a verdadeira inovação na descoberta de fármacos é uma necessidade de sobrevivência para essas companhias (BENNANI, 2011).

Dessa forma, apesar do grande avanço da síntese orgânica e da química combinatória e o intenso investimento, por parte das indústrias, nessas metodologias, o fato de os produtos naturais se apresentarem como os maiores detentores de diversidade e complexidade químicas (HARVEY, 2000) garante seu futuro como principal fonte de agentes terapêuticos ainda por muitos anos (PATERSON e ANDERSON, 2005).

Em sua mais recente pesquisa, NEWMAN e CRAGG (2012) reafirmam a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos. Considerando a manutenção da estrutura química da substância, alguma modificação na mesma, ou apenas sendo modelo para uma síntese total, os produtos naturais estão envolvidos

em mais de 50% dos novos fármacos lançados durante o período de 1981 a 2010.

1.2 Biodiversidade, Mata Atlântica e conservação

Biodiversidade corresponde à variedade e a variabilidade que existem entre os organismos do planeta e engloba, além de outros fatores, a diversidade de espécies de fauna e flora. “A vida humana depende diretamente da biodiversidade, pois ela é fonte de alimentos, medicamentos, além de diversas outras facilidades para a vida nas sociedades contemporâneas” (ROY *apud* SOUZA, MELLO, LOPES, 2012).

O Brasil apresenta entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial (BARREIRO e BOLZANI, 2009) e um de seus biomas, a Mata Atlântica, exibe um dos mais altos graus de riqueza de espécies e taxa de endemismo do planeta (RIBEIRO, METZGER, MARTENSEN *et al*, 2009), sendo considerada um dos atuais 34 *hotspots* mundiais de biodiversidade (*Conservation International*, 2013).

Hotspots de biodiversidade, termo utilizado pela primeira vez por Norman Myers em 1988, são áreas que concentram grande número de espécies e também elevado endemismo. Para a classificação de um bioma como *hotspot*, dois critérios devem ser atendidos: a área precisa conter, como endêmicas, pelo menos 0,5% ou 1.500 das 300.000 espécies de plantas estimadas do planeta; e deve ter perdido pelo menos 70% do seu habitat original (MYERS, MITTERMEIER, da FONSECA *et al*, 2000, *Conservation International*, 2013).

A Mata Atlântica encaixa-se em tal conceito, pois estendia-se quase continuamente desde o Rio Grande do Norte e Ceará até o Rio Grande do Sul, entretanto já perdeu mais de 93% de sua área e menos de 100.000km² remanesce (TABARELLI, PINTO, SILVA *et al*, 2005). Embora tenha sido em grande parte destruída, a floresta ainda abriga mais de 8.000 espécies de plantas endêmicas, contando com uma das maiores taxas de endemismo do mundo. Além disso, sabe-se que nestes tipos de vegetação, altamente heterogêneas e diversificadas, devem existir muitas espécies desconhecidas (MYERS, MITTERMEIER, da FONSECA *et al*, 2000).

Mesmo ostentando o título de ser um dos biomas mais degradados do planeta e correr sérios riscos de extinção (HANAZAKI, TAMASHIRO, LEITÃO-FILHO *et al*, 2000), a garantia da preservação da Mata Atlântica ainda é insuficiente. Apesar de a preocupação e as iniciativas para conservação terem crescido nas últimas décadas (TABARELLI, PINTO, SILVA *et al*, 2005, RIBEIRO, METZGER, MARTENSEN *et al*, 2009), a biodiversidade, em geral, continua em declínio (BUTCHART, WALPOLE, COLLEN *et al*, 2010). Visto ser considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, o desaparecimento dessa biodiversidade leva, por consequência, a perda de muitas informações biológicas e de caráter terapêutico. Portanto, a preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco de riqueza biológica como pelo grande potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

1.3 Família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae, uma das diversas famílias presentes na Mata Atlântica, é composta por mais de 300 gêneros e 8.000 espécies e seus membros estão distribuídos ao redor de todo o mundo, havendo exemplares que sobrevivem tanto nas condições secas e quentes do deserto, assim como em florestas úmidas (MWINE e VAN DAMME, 2011), onde são mais usualmente encontrados.

Há espécies economicamente importantes e tradicionais como *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Manihot esculenta* (mandioca), e membros dos gêneros *Jatropha*, *Croton* e *Ricinus*, de onde são extraídos óleos para variados fins industriais. Além disso, plantas daninhas e venenosas como *Euphorbia maculata* e *Ricinus communis* (mamona), respectivamente, também fazem parte da família (PALATNICK e TENENBEIN, 2000, MWINE e VAN DAMME, 2011). Visto ainda apresentar relações com a medicina popular, englobando, por exemplo, espécies de *Croton*, *Phyllanthus*, *Mabea* e *Euphorbia* (Tabela 1), a família é bastante complexa e de grande potencial para pesquisa (MWINE e VAN DAMME, 2011).

Tabela 1. Espécies da família Euphorbiaceae, alguns nomes populares e usos na medicina tradicional. FONTE: STASI e HIRUMA-LIMA, 2002.

Espécie	Nome popular	Parte da planta	Medicina tradicional
<i>Croton cajucara</i>	Sacaca / Cajucara	Folhas	Dor de estômago / Febre / Malária / Icterícia / Hepatite
<i>Croton sacaquinha</i>	Sacaquinha	Folhas	Problemas no fígado / Malária
<i>Jatropha curcas</i>	Peão-branco / Pinhão-branco / Mandobiguaçu / Maduri-graça	Folhas / Sementes	Constipação nasal / Sinusite / Purgativo / Cefaléia / Febre
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Peão-roxo / Jalopão / Mamoninha / Raiz-de-téu	Folhas / Sementes	Antisséptico / Cefaléia / Purgativo / Reumatismo / Febre
<i>Mabea angustifolia</i>	Canudo-de-pito / Tacoari	Cascas	Febre
<i>Phyllanthus corcovadensis</i>	Quebra-pedra / Erva-pombinha	Raiz / partes aéreas / Folhas	Diurético / Cálculos renais / Icterícia

Euphorbiaceae é assinalada como uma família produtora de diversificados compostos químicos pelo fato de possuir representantes em todos os diferentes tipos de vegetação, o que lhe confere, portanto, elevada variabilidade, visto ocuparem uma larga faixa de disparidades climáticas e de solo (SÁTIRO e ROQUE, 2008, MWINE e VAN DAMME, 2011). Sabe-se que diferentes condições de habitat - pH, temperaturas, solo, umidade - tendem a influenciar os processos fisiológicos da planta (BLOOMQUIT, 2004, AHMAD, 2006), e levar a produção de diferentes metabólitos; devido aos mais diversos mecanismos de adaptação que ela desenvolve para suportar variados estímulos ambientais.

Dentre as classes de substâncias isoladas das espécies, encontram-se: saponinas; taninos; iridoides e terpenos em geral; alcaloides, diversos tipos de flavonoides e outros compostos fenólicos (KOTHALE, ROTHE, PAWADE, 2011, MWINE e VAN DAMME, 2011) (Tabela 2). Os diterpenos são considerados como o grupo de substâncias mais característico e complexo da família (SALATINO, O., SALATINO. M. e NEGRI, 2007).

Tabela 2. Algumas classes de substâncias químicas encontradas em Euphorbiaceae e suas indicações terapêuticas. Fonte: MWINE e VAN DAMME, 2011 (modificado).

Substância	Indicação Medicinal
Diterpenos	Antitumoral / Antibiótico / Antifúngico / Antiplasmodial
Triterpenos	Antibiótico / Vasodepressor / Antiinflamatório / Analgésico / Antifúngico
Flavonóides	Antimalárico / Antiinflamatório
Saponinas	Citotóxico / Antiulceroso
Taninos	Antisséptico / antiviral / antimutagênico / antifúngico
Alcalóides	Antimicrobiano / antitumoral
Ésteres	Antibiótico / Citotóxico
Ricina	Citotóxico / Lipolítico
Fenóis	Antitumoral / Antioxidante

1.3.1 *Pachystroma longifolium* (Nees) I. M. Johnst

De nome popular canxim, *Pachystroma longifolium* é uma árvore da família Euphorbiaceae que pode chegar até 20 metros de altura. É muito lactescente e de madeira leve e elástica (LORENZI, 2008). No Brasil, pode ser encontrada principalmente no Sul e Sudeste, abrangendo São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Também está presente no Estado do Espírito Santo, contudo não é uma planta endêmica do Brasil; sendo muito encontrada em locais de altitude elevada, como Bolívia, e próximo a cursos de água em geral (ALCALÁ, 2010, PINHO, RIBEIRO, RABELO *et al*, 2009).

A espécie é considerada bioacumuladora de elementos terras raras, pois se observou altas concentrações dos mesmos em suas folhas e próximos de suas raízes quando a planta está situada ao redor de regiões como refinarias de petróleo e estradas (FRANÇA, FERNADES, BACCHI *et al*, 2002). Plantas bioacumuladoras podem informar a qualidade do meio ambiente ou serem utilizadas como biomonitoras, quantificando essa qualidade (ALCALÁ, 2010). Essa característica presente em *P. longifolium* pode, então, indicar impactos antrópicos no local onde se situa (FRANÇA, FERNADES, BACCHI *et al*, 2002).

Apesar de vários estudos de caráter ecológico (ALCALÁ, 2010, FRANÇA, FERNANDES, BACCHI *et al*, 2002, PINHO, RIBEIRO, RABELO *et al*, 2009, HORA e SOARES, 2002, SOUZA e VÁLIO, 2001), morfológico e também do látex de suas folhas (RABELO, MARQUES, ZOTTICH *et al*, 2011), *Pachystroma longifolium* carece de informações químicas e quanto a possíveis atividades biológicas, não havendo trabalhos publicados nesses aspectos. É, por consequência, uma espécie com potencial para descoberta de moléculas novas e/ou bioativas.

1.4 Busca por atividades biológicas

O estudo químico de produtos de origem natural frequentemente é acompanhado de sua avaliação biológica. Neste trabalho, os extratos e/ou substâncias puras, advindos das folhas de *P. longifolium*, foram submetidos a ensaios de inibição de catepsinas e/ou células tumorais.

Este estudo integra a rede de pesquisa Sisbiota, composta pelos grupos da Universidade Federal do Espírito Santo (Campus Goiabeiras), Universidade Federal de São Carlos (Campus São Carlos), Universidade Federal de Goiás (Campus Catalão) e Universidade Federal de São Paulo (Campus Diadema), a qual propõe a prospecção química e biológica de plantas pertencentes ao Cerrado e Mata Atlântica com o objetivo de fornecer dados que estimulem a preservação desses biomas, juntamente com a descoberta de novos compostos bioativos.

1.4.1 Inibição de enzimas

Enzimas são macromoléculas responsáveis por catalisar reações biológicas fundamentais no organismo. Devido a essas proteínas estarem envolvidas nos mais diversos caminhos fisiopatológicos e desempenharem funções altamente específicas, são alvos terapêuticos muito atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos (MARQUES, 2011, SEVERINO, 2008). A inibição seletiva de enzimas críticas de organismos infecciosos – bactérias, fungos e vírus, por exemplo – é um meio interessante de intervenção quimioterápica em doenças infecciosas e, atualmente, existe uma vasta gama de fármacos antimicrobianos os quais atuam por esse mecanismo. Além disso, apesar de toda a sua importância, a atividade

desregulada ou anormal das mesmas também pode levar a sérias complicações e, conseqüentemente, enzimas humanas também fazem parte da intervenção farmacológica em inúmeros tipos de doença (COPELAND, 2005).

Mais especificamente, as enzimas chamadas cisteíno peptidases lisossomais são encontradas nas mais variadas formas de vida, incluindo vírus, fungos, bactérias, plantas, invertebrados e mamíferos, e caracterizam-se como uma numerosa e importante família (TURK e GUNCAR, 2003). São responsáveis pela quebra de ligações peptídicas em proteínas e estão envolvidas em diversos processos biológicos. O termo “cisteíno” corresponde ao aminoácido que está presente no sítio catalítico e, apesar do nome, descobriu-se posteriormente que não se localizam apenas nos lisossomos e podem se acumular em diferentes tecidos (MOHAMED e SLOANE, 2006).

Nos mamíferos, todas as cisteíno peptidases são conhecidas como catepsinas, porém o contrário não é verdadeiro (PALERMO e JOYCE, 2007), visto que elas estão classificadas em aspartil peptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (A e G) e cisteíno peptidases (B,C,F,H,K,L,O,S,V,W, e X) (TURK e GUNCAR, 2003, MARQUES, 2011). Dessas últimas (as catepsinas), B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X são catalogadas como presentes em humanos; totalizando 11 enzimas. Diferentes funções fisiológicas foram relatadas para as mesmas e, por estarem também associadas a diversos processos patológicos, despertaram o interesse de indústrias farmacêuticas (KUESTER, LIPPERT, ROESSNER *et al*, 2008).

Dentre as enzimas estudadas neste trabalho, a catepsina K, presente de forma predominante nos osteoclastos, está associada ao desenvolvimento de osteoporose. Por sua vez, a catepsina L, relatada nos mais variados tipos celulares, relaciona-se com artrite e progressão de tumores, enquanto que a catepsina V, fisiologicamente associada ao complexo de histocompatibilidade maior de classe II (MHC II) e seleção de linfócitos T, é considerada como marcadora de diagnóstico de tumores de cólon; estando também associada a doenças cardiovasculares e inflamações e carcinomas em geral (MARQUES, 2011, LETO, SEPPORTA, CRESCIMANNO *et al*, 2010, LANKELMA, VOOREND, BARWARI *et al*, 2010, YASUDA, GREENBAUM, BOGBO *et al*, 2004).

1.4.2 Câncer

O câncer é líder em número de mortes em países desenvolvidos e a segunda maior causa nos países em desenvolvimento. Os mais prevalentes são os cânceres de pulmão e próstata, em homens, enquanto o câncer de mama está em primeiro lugar para as mulheres (JEMAL, BRAY, CENTER *et al*, 2011). Apesar de o tratamento abranger diferentes terapias, ainda não se atingiu um patamar adequado (ANJOS e ZAGO, 2006), visto que existem desfavoráveis e graves problemas de reações adversas devido à falta de especificidade para células cancerígenas. Além do fato de vários tipos de cânceres ainda não possuírem cura.

É possível aliar o valor potencial da biodiversidade com a necessidade de busca por novos quimioterápicos. Este elo já foi criado há muito tempo e a relação de produtos naturais como agentes anticancerígenos é amplamente difundida, sendo que vários desses produtos foram e continuam sendo descobertos, modificados e desenvolvidos como fármacos importantes: paclitaxel (**V**) (extraído de *Taxus brevifolia*), camptotecina (**VI**) (*Camptotheca acuminata*), etoposídeo (derivado semi-sintético da podofilotoxina (**VII**), extraída da *Podophyllum peltatum*), *trans*-desidrocrotonina ou *trans*-DCTN (**VIII**) (*Croton cajucara*) (Figura 2); e as já citadas vincristina (**III**) e vimblastina (**IV**) (Figura 1) (MA e WANG, 2009).

Comparando-se a compostos provenientes de síntese, os produtos naturais, oriundos de plantas, microrganismos, animais ou organismos marinhos, frequentemente parecem ser mais efetivos e/ou menos tóxicos em relação ao combate do câncer; e, portanto, apresentam-se como mais interessantes nesse aspecto (MA e WANG, 2009).

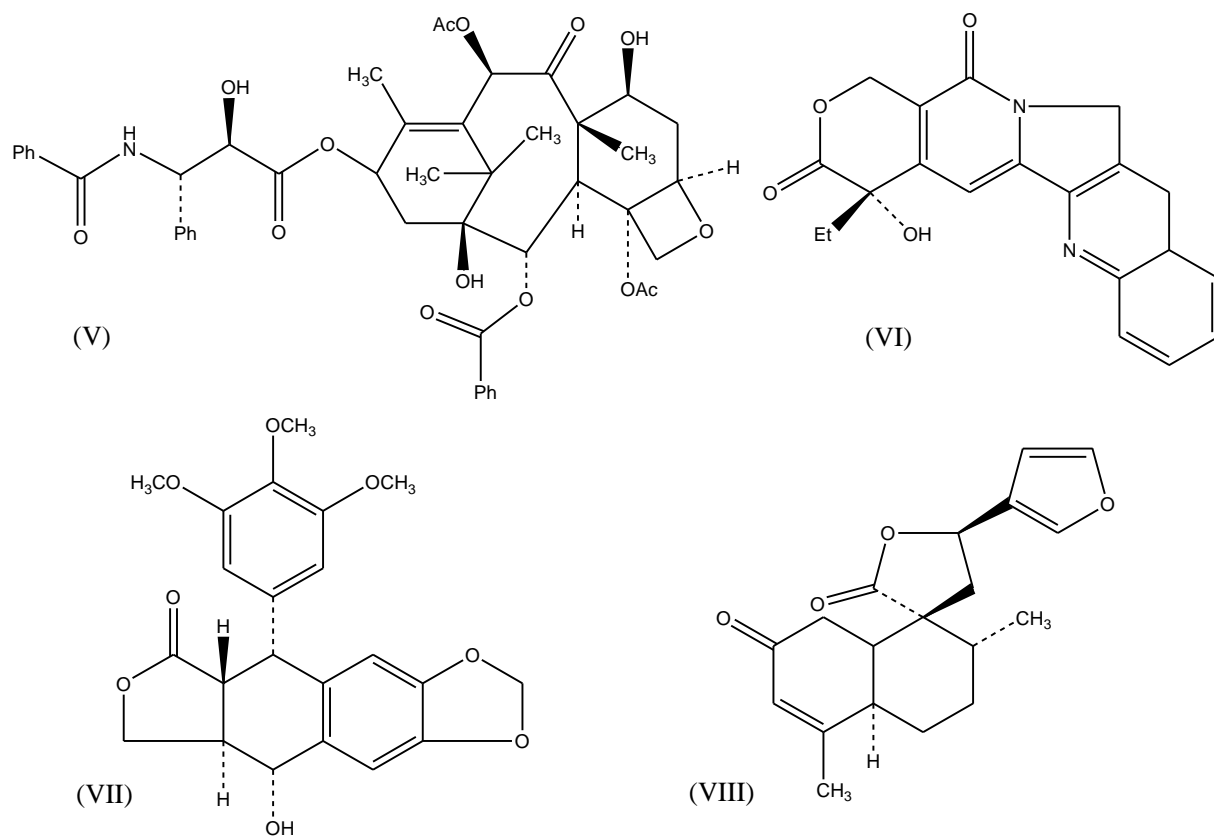


Figura 2. Estruturas químicas das moléculas de paclitaxel (V), camptotecina (VI), podofilotoxina (VII) e *trans*-DCTN (VIII).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico e avaliação de atividades biológicas/bioquímicas dos extratos e substâncias isoladas das folhas de *Pachystroma longifolium*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e elucidar a estrutura química de metabólitos secundários presentes nas folhas de *Pachystroma longifolium*.
- Avaliar o potencial dos extratos da espécie quanto à inibição de células tumorais e catepsinas K, L e V.
- Avaliar o potencial das substâncias isoladas quanto à inibição de catepsinas K, L e V.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e instrumentação

3.1.1 Materiais para estudo químico

- Solventes:
 - Comerciais: hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol.
 - HPLC: hexano, acetato de etila e metanol (Panreac).
 - RMN: acetona-D₆, CDCl₃, CD₃OD e DMSO-D₆ (Sigma Aldrich).
- Evaporador rotatório: bomba de vácuo Buchi V-700.
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN): espectrômetro Varian 400 MHz, com sonda 5 mm ATB BroaBand ¹H/¹⁹F/X e TMS como padrão de referência.
- Espectrometria de Massas (EM): equipamento Esquire 3000 Plus.
 - Infusão direta de amostras solubilizadas em MeOH:H₂O (9:1).
 - Fonte de Ionização: Ionização Química.
 - Analisador: Tempo de Voo (TOF).
- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM): cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu modelo QP-5050, equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% Fenil, 95% dimetilpolisiloxano) marca J&W Scientific de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme; e hélio como gás de arraste.
 - Condições de análise: pressão interna da coluna de 118,5 kPa; razão de split de 1:60; fluxo de gás na coluna de 83,1 mL/min; temperatura no injetor: 270 °C; temperatura no detector: 290 °C; programação da coluna: 150 °C (1 min) até 290 °C (9 min).
 - Bibliotecas utilizadas NIST (National Institute of Standards of Technology): NIST21 e NIST107.

- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): placas de sílica gel 60 G Merck observadas em radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e reveladas com solução sulfúrica de vanilina e vapor de iodo.
- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP): placas de vidro recobertas com suspensão de sílica gel 60 G Merck.
- Cromatografia Líquida em Coluna (CLC): fases estacionárias sílica gel 60 G Merck e Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich.
- Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV): bomba de vácuo Buchi V-700 e sílica gel 60 G Merck como fase estacionária.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): equipamento Agilent G1311C-1260 de bomba quaternária e acoplado a detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD) modelo G1315D-1260.
 - Sistema analítico de fase reversa: coluna Phenomenex C18 (5 µm, 4,8 x 250 mm); fluxo de 1 mL/min composto por mistura de H₂O e MeOH (iniciando em 90:10, passando por 100% de MeOH aos 40 min e retornando a proporção 90:10 aos 46 min até 50 min); volume de injeção de 20 µL.
 - Sistema analítico de fase normal: coluna Zorbax RX-SIL (5 µm, 4,8 x 250 mm); fluxo de 1 mL/min composto por mistura de Hex e AcOEt (iniciando em 90:10, passando por 100% de AcOEt aos 40 min e retornando a proporção 90:10 aos 46 min até 50 min); volume de injeção de 20 µL.
 - Sistema semi-preparativo de fase reversa: coluna Eclipse XDB-C18 (5 µm, 9,4 x 250 mm); sob iguais condições do sistema analítico correspondente, com fluxo alterado para 4 mL/min; volume de injeção de 1mL.

3.1.2 Materiais para ensaio de inibição de catepsinas

- Espectrofluorímetro: leitor de placa com 96 poços Molecular Devices Spectra modelo MAX M3;
- Inibidor irreversível específico de cisteíno peptidase E-64;

- DTE (Sigma Aldrich);
 - Substrato Z-FR-MCA (Bachem Inc e Sigma);
 - Acetato de sódio trihidratado (J.T. Baker);
 - EDTA (J.T. Baker);
 - Catepsinas K, L e V recombinantes humanas expressas em *Pichia pastoris* e cedidas pelo Prof. Dr. Marcio Fernando Madureira Alves, da Universidade Federal de São Paulo.
- Enzimas estocadas em soluções contendo 0,01% de Tween 20 (v/v).

3.1.3 Materiais para ensaio de inibição de células tumorais

- Espectrofotômetro Awareness Technology INE, Stat Fax 2100;
- Meio RPMI-1640, glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma);
- Soro bovino fetal (Cultilab);
- Solução de MTT (Kit Boehringer Mannheim);
- Linhagem celular sarcoma-180.

3.2 Obtenção do material vegetal

A planta foi coletada no Morro do Moreno na cidade de Vila Velha – Espírito Santo, pela manhã, na data de 20 de janeiro de 2012. Obteve-se um total de quatro quilos de folhas frescas.

A identificação da espécie foi feita pela Prof.Dra. Luciana Diaz Thomas, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Uma exsicata foi depositada no herbário VIES da mesma instituição sob número 26618.

3.3 Obtenção dos extratos

As folhas foram secas em estufa por um período de sete dias. Procedeu-se com a moagem, utilizando liquidificador, e obteve-se 1,4 Kg de extrato seco.

Para extração dos constituintes químicos das folhas, pelo processo de maceração, foi utilizado etanol durante três dias. O procedimento foi repetido três

vezes. Após, usou-se também o solvente acetato de etila por igual número de vezes e dias.

Reuniram-se os extratos e o extrato bruto (W9F) obtido foi, então, conduzido ao evaporador rotatório para concentração da amostra.

O extrato bruto foi ressuspendido em uma solução de metanol:água 1:3 e realizou-se partição líquido-líquido, utilizando os solventes hexano e acetato de etila. Após um total de dez procedimentos de partição para cada um dos solventes citados, obtiveram-se os extratos hexânico (W9FH) e acetato de etila (W9FA) com massas de 42,8766g e 27,9999g, respectivamente. A fração hidroalcóolica restante foi congelada (W9FHA) (Figura 3).

3.4 Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila (W9FA)

Devido a grande quantidade de massa do extrato, optou-se por realizar uma CLV, utilizando gradiente de hexano, acetato de etila e metanol. Após análise por CCDC, dez frações foram obtidas, das quais W9FA1 e W9FA10 não foram trabalhadas. A Figura 3 ilustra as respectivas massas e o procedimento realizado.

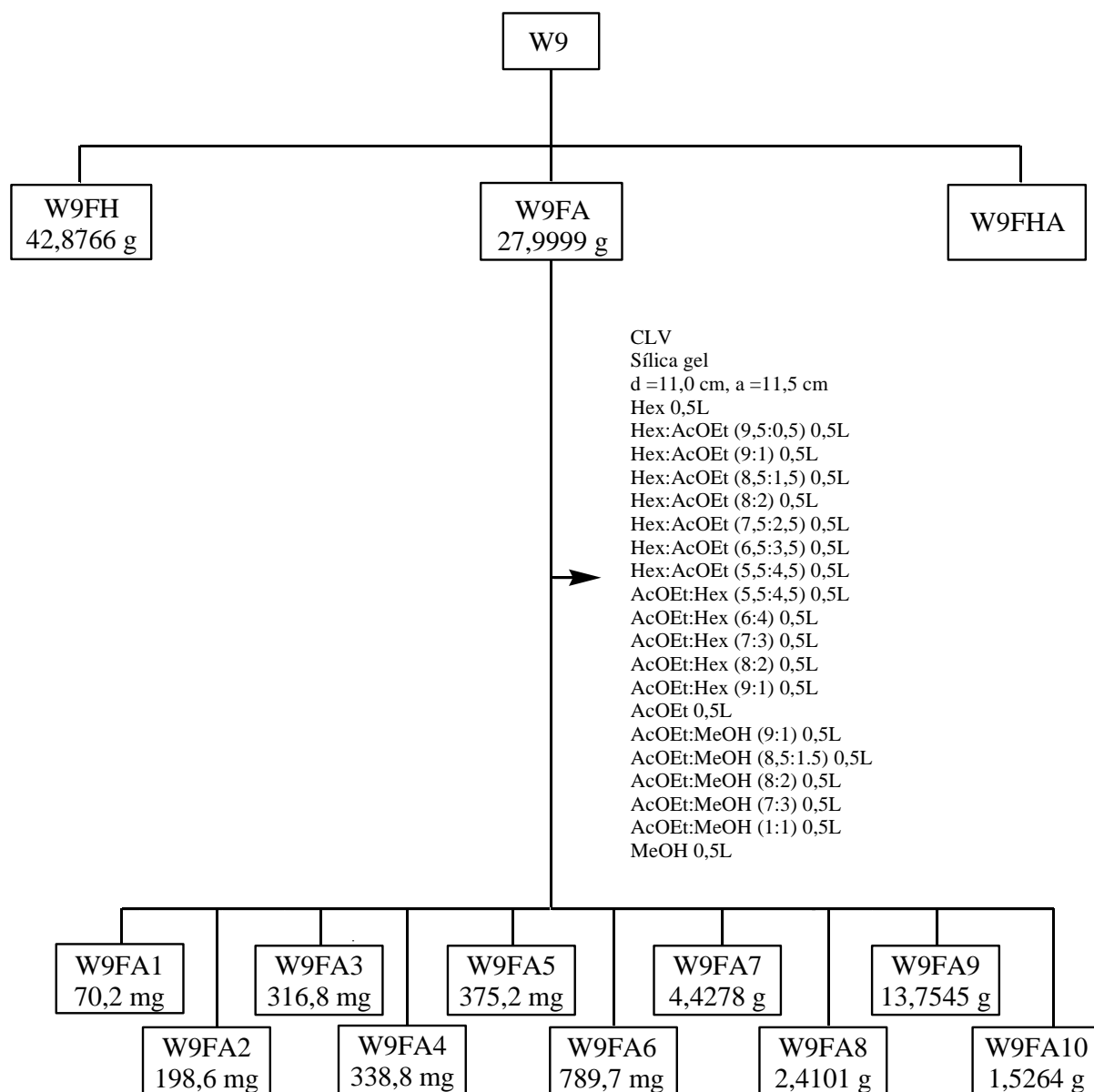


Figura 3. Frações a partir do extrato bruto (W9F) e fracionamento cromatográfico inicial da fração W9FA.

- Fração W9FA2: após fracionamento por CLC (Figura 4), as subfrações obtidas foram analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - W9FA2.4 (12,5 mg), 2.7 (22,9 mg) e 2.9 (10,1 mg) foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H (CDCl_3).
 - W9FA2.10 (10,9 mg) gerou uma pequena quantidade de cristais de coloração branca (0,9 mg) que foram separados e transferidos para outro frasco. Para análise dos cristais por RMN de ^1H , tentou-se solubilização em CHCl_3 , acetona, MeOH e DMSO.

- Fração W9FA3: também se fez análises por CCDC e CLAE analítica de fase normal para todas as subfrações resultantes do procedimento em CLC (Figura 4).
 - W9FA3.1 (16 mg), 3.3 (4,1 mg) e 3.4 (4,2 mg) foram analisadas por RMN de ^1H (CDCl_3).
- Fração W9FA4: posterior ao fracionamento cromatográfico (Figura 4), todas as subfrações geradas foram analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase normal e de fase reversa.
 - W9FA4.1 (59,4 mg), 4.2 (14,2 mg), 4.5 (13,3 mg), 4.6 (54,5 mg), 4.7 (29,3 mg) e 4.8 (99,4 mg) foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H (CDCl_3).
 - W9FA4.4 (17,9 mg) foi direcionada à CLAE semi-preparativa de fase reversa e as subfrações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H (acetona- D_6).
- Fração W9FA5: esta amostra foi submetida à CLC (figura 5), gerando onze subfrações posteriormente analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase reversa.
 - W9FA5.1, 5.2, 5.5 e 5.6 foram analisadas por RMN de ^1H (acetona- D_6).
 - W9FA5.3 e 5.4 foram encaminhadas para separação por CCDP.
 - W9FA5.7 foi submetida à CLC de gel de sílica e as subfrações resultantes analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase reversa.
 - W9FA5.7.4 e 5.7.5 foram reunidas e direcionadas à CLAE semi-preparativa. A análise dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) das subfrações resultantes conduziu ao isolamento da loliolida (**1**), amostra codificada como W9FA5.7(4,5)5.
- Fração W9FA6: fracionada por CLC utilizando Sephadex, como fase estacionária, e eluição isocrática com MeOH (Figura 6). Perfis em CLAE analítica de fase reversa e espectros de RMN de ^1H (CD_3OD) foram realizados para todas as subfrações resultantes desse procedimento.
 - W9FA6.5 foi submetida à CLAE semi-preparativa de fase reversa.
 - W9FA6.2 e 6.3 foram direcionadas à CLC e as subfrações resultantes

analisadas por CLAE analítica de fase reversa.

- W9FA6.2.2 e 6.2.3, encaminhadas para CLAE semi-preparativa, conduziram ao isolamento do galato de etila (**2**) (W9FA6.2.3.4), a partir dessa última subfração.

- Fração W9FA7: as subfrações resultantes da separação cromatográfica inicial (Figura 7) foram analisadas por CLAE analítica de fase reversa.
 - W9FA7.1 e 7.7 foram conduzidas à separação cromatográfica por CLAE semi-preparativa. As subfrações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H (CD_3OD).
 - W9FA7.4 foi submetida à CLAE semi-preparativa e, das subfrações resultantes, foram isolados o ácido gálico (**3**) e protocatecuato de metila (**4**); amostras codificadas, respectivamente, como W9FA7.4.5 e W9FA7.4.6.
- Fração W9FA8: as subfrações, provenientes do procedimento de separação em CLC de gel de sílica (Figura 4), foram analisadas por CLAE analítica de fase reversa.
- Fração W9FA9: geradas por procedimento de CLV (Figura 4), as subfrações foram submetidas à análise por CLAE analítica de fase reversa.

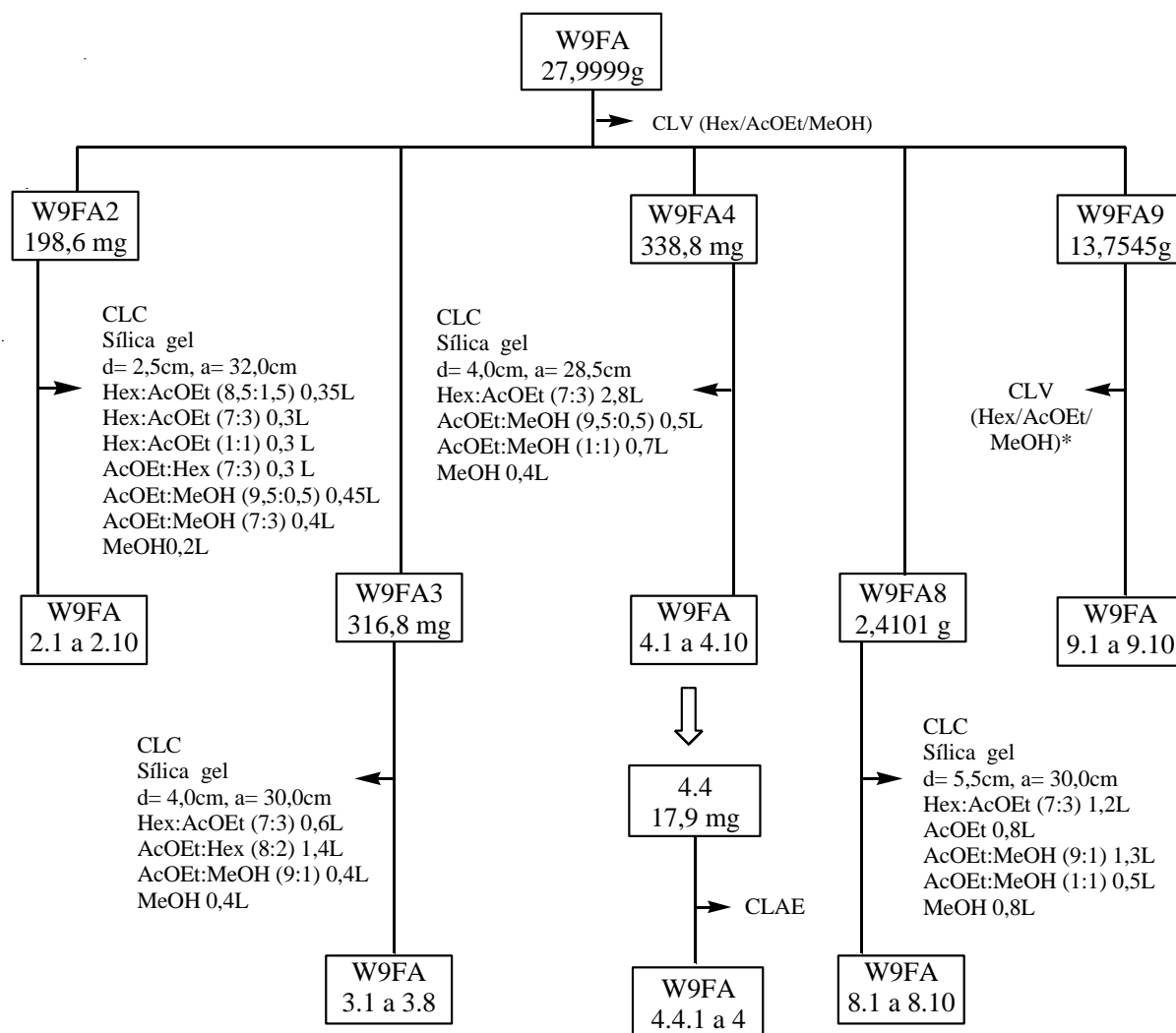


Figura 4. Fracionamento cromatográfico para as frações W9FA2, W9FA3, W9FA4, W9FA8 e W9FA9.

*Condições cromatográficas para CLV iguais àquelas apresentadas na Figura 3. **Condições para CLAE descritas na página 32.

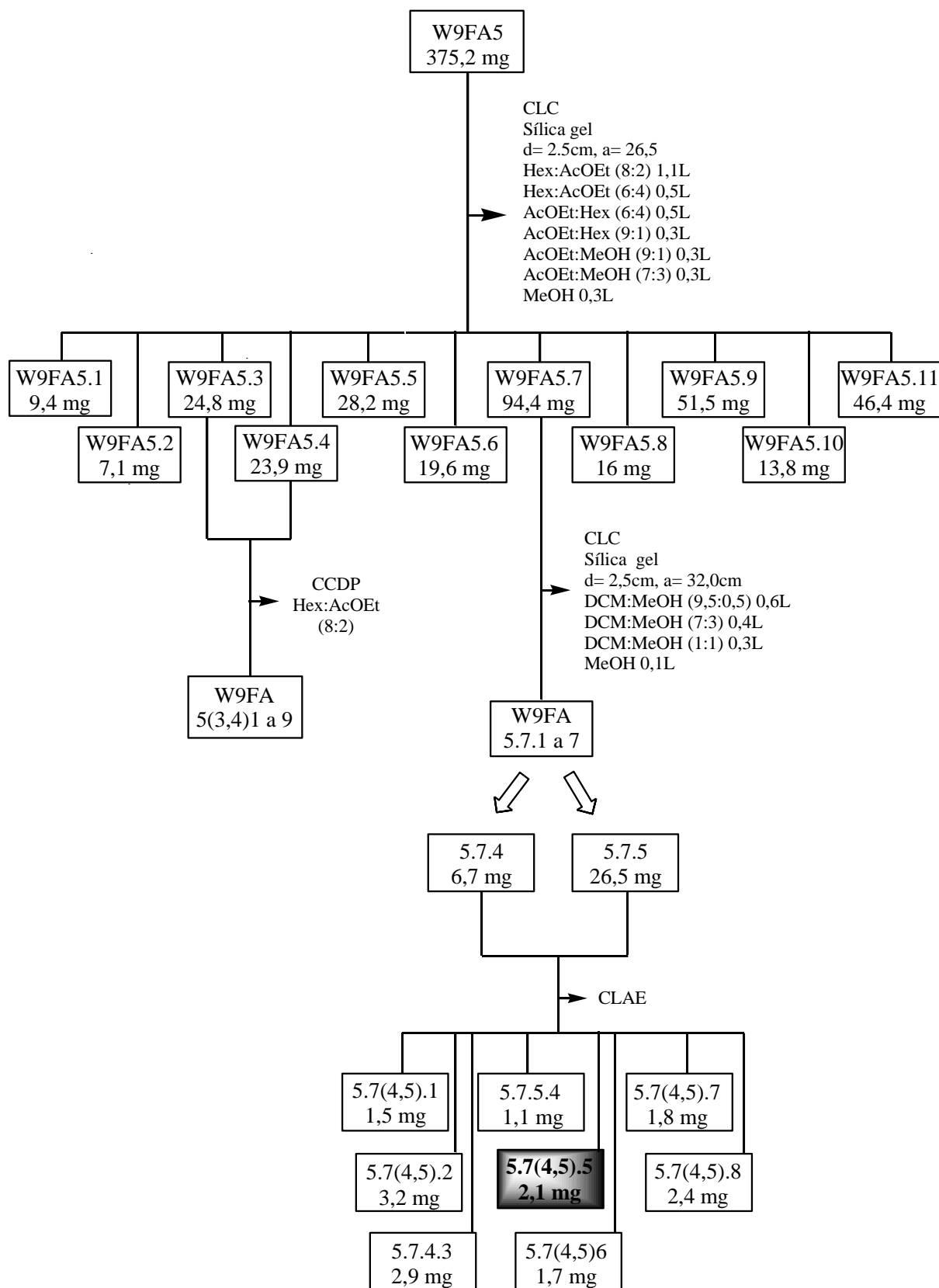


Figura 5. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA5. *Condições para CLAE descritas na página 32.

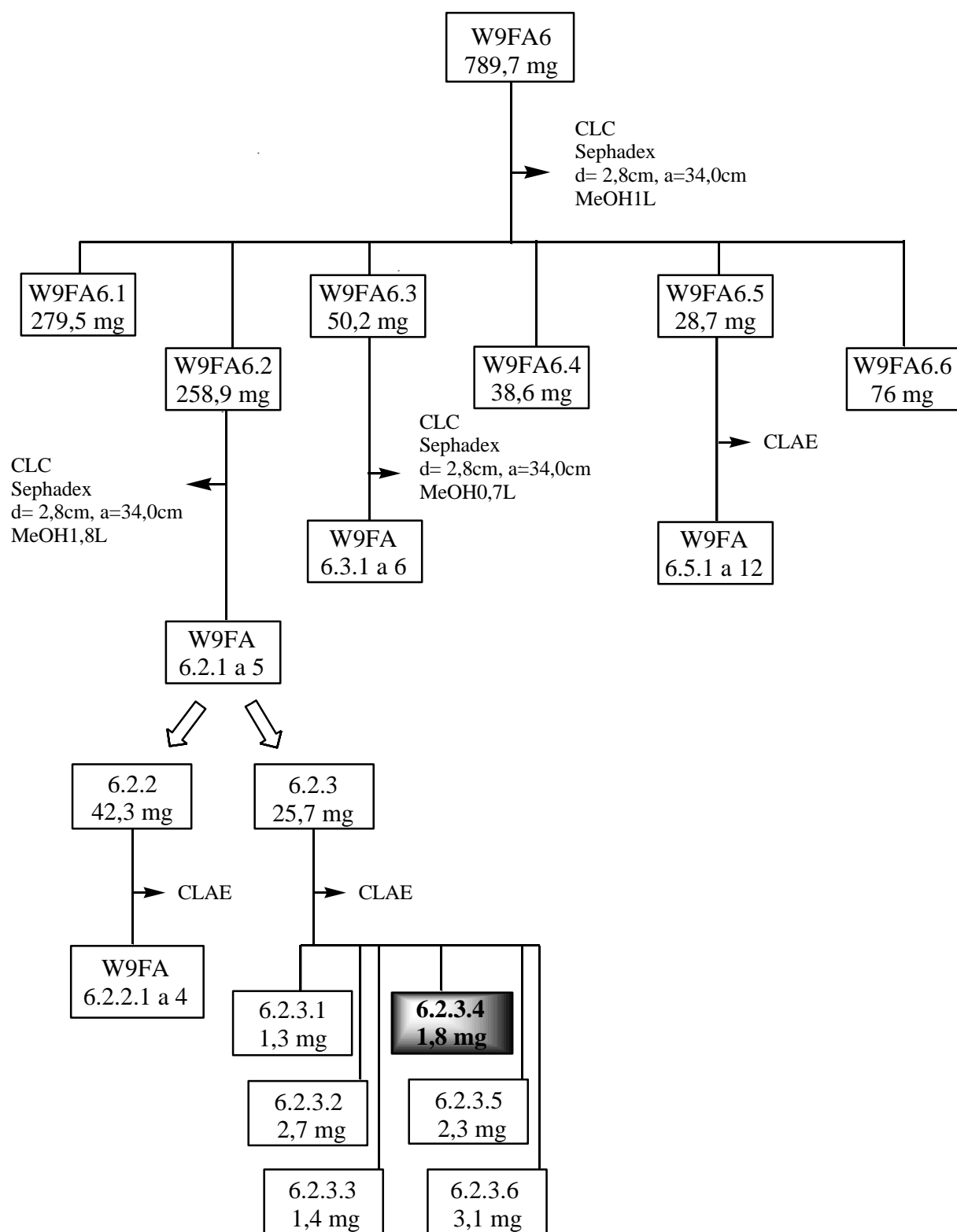


Figura 6. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA6. *Condições para CLAE descritas na página 32.

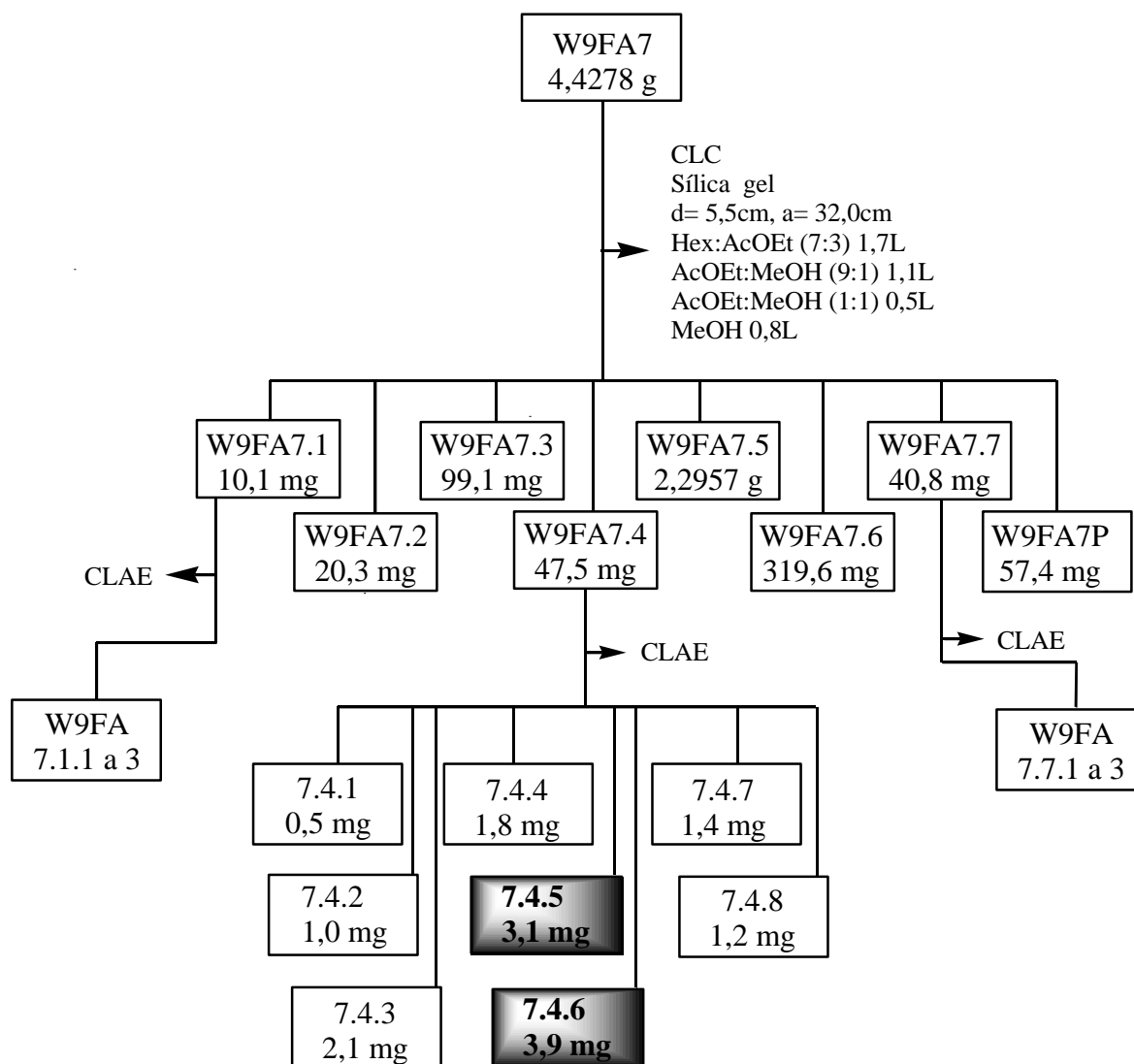


Figura 7. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FA7. *Condições para CLAE descritas na página 32.

3.5 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (W9FH)

Devido a grande quantidade de massa do extrato, realizou-se uma CLV, com gradiente de hexano, acetato de etila e metanol. Sete frações foram obtidas, sendo que todas foram analisadas por CCDC e RMN de ^1H (CDCl_3 e CD_3OD), e W9FH1, 4 e 7 não foram trabalhadas. A Figura 8 demonstra as respectivas massas.

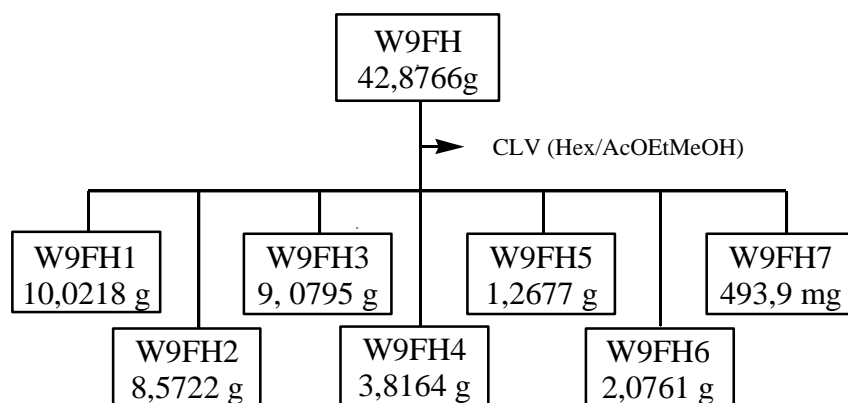


Figura 8. Fracionamento cromatográfico inicial para a fração W9FH. *Condições cromatográficas para CLV iguais àsquelas apresentadas na Figura 3.

- Frações W9FH2 e W9FH3: essas amostras foram reunidas (codificadas como W9FH2) e submetidas a um procedimento de CLV (Figura 9) utilizando gradiente de Hex, AcOEt e MeOH. As subfrações obtidas foram analisadas por CCDC.
 - W9FH2.5 e W9FH2.6 foram fracionadas por CLC, gerando sete subfrações cada, as quais foram analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - As amostras W9FH2.5.1 (9,9 mg), 2.5.2 (4,9 mg), 2.5.3 (6,5 mg), 2.5.5 (74,9 mg) e também W9FH2.6.2 (1,8 mg), 2.6.3 (1,2 mg) e 2.6.6 (4,4 mg) foram analisadas por RMN de ^1H (CDCl_3) e CG-EM.
- Fração W9FH5: esta amostra foi submetida à CLC utilizando gel de sílica (Figura 10), gerando treze subfrações posteriormente analisadas por CCDC.
 - W9FH5.3, 5.5, 5.6 e 5.9 foram fracionadas por meio de CLC. Todas as subfrações resultantes foram encaminhadas para análise por CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - As subfrações W9FH5.3.1, 5.3.2, 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3, 5.6.2, 5.6.4, 5.9.1 e 5.9.2 foram analisadas por RMN de ^1H (CDCl_3) e CG-EM.
 - Na subfração W9FH5.5.1, foi identificada a mistura de α -amirina (**5**), β -amirina (**6**) e lupeol (**7**).
 - Em W9FH5.3.2, foi identificada a substância β -amirina (**6**).
 - O sitosterol (**8**) foi identificado na subfração W9FH5.6.2.

- Fração W9FH6: posterior ao processo cromatográfico inicial (figura 9), as subfrações geradas foram analisadas por CCDC.
 - W9FH6.2, W9FH6.3 e W9FH6.4 foram fracionadas por CLC, gerando subfrações que, posteriormente, foram analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - W9FH6.2.1 (2,1 mg), 6.2.2 (1,9 mg), 6.2.8 (4,2 mg), 6.3.1 (4,1 mg), 6.3.2 (12,5 mg) e 6.4.2 (2,9 mg) foram direcionadas para análise por RMN de ^1H (CDCl_3) e CG-EM.

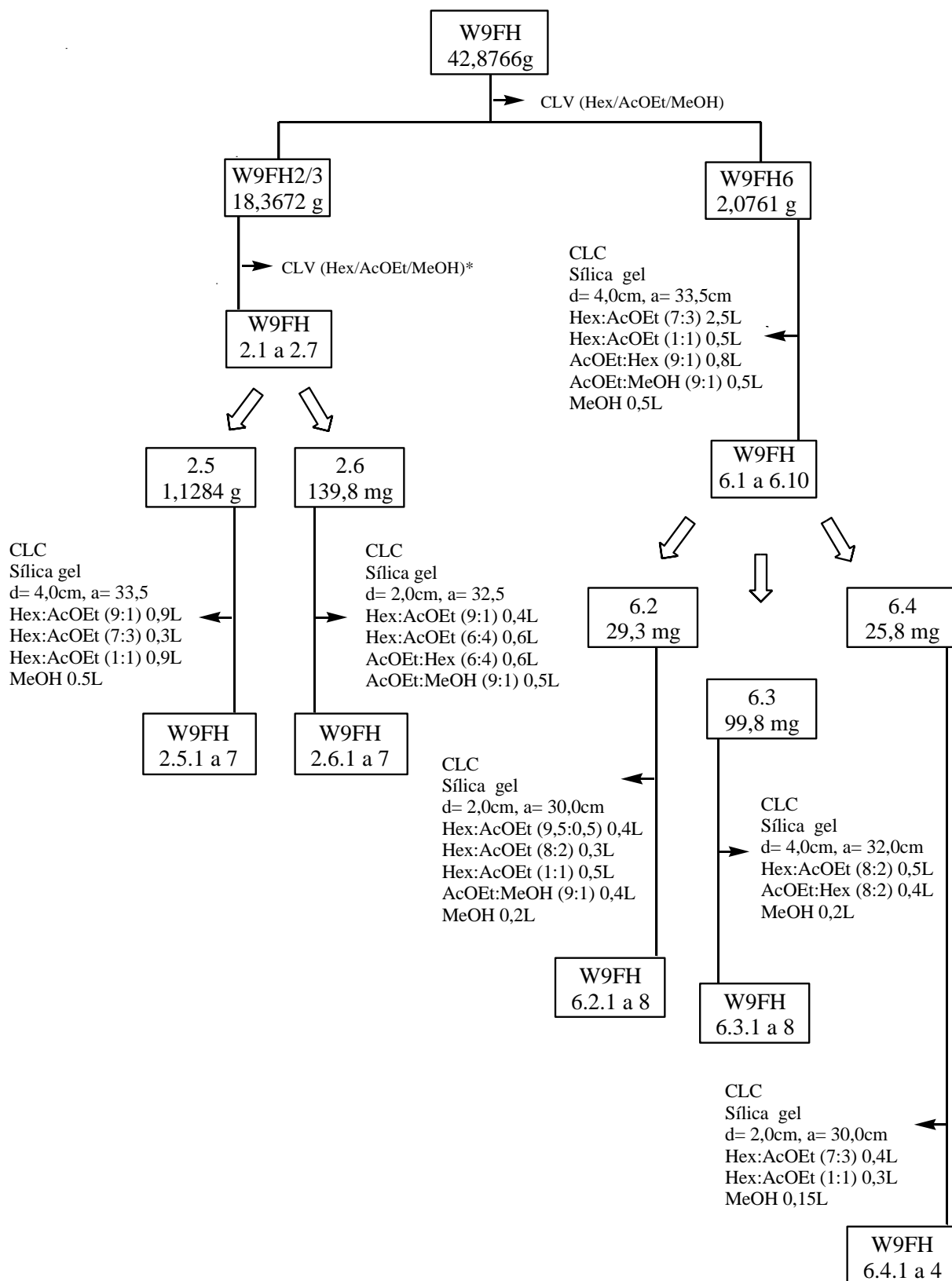


Figura 9. Fracionamento cromatográfico para as frações W9FH2/3 e W9FH6. *Condições cromatográficas para CLV iguais àquelas apresentadas na Figura 3.

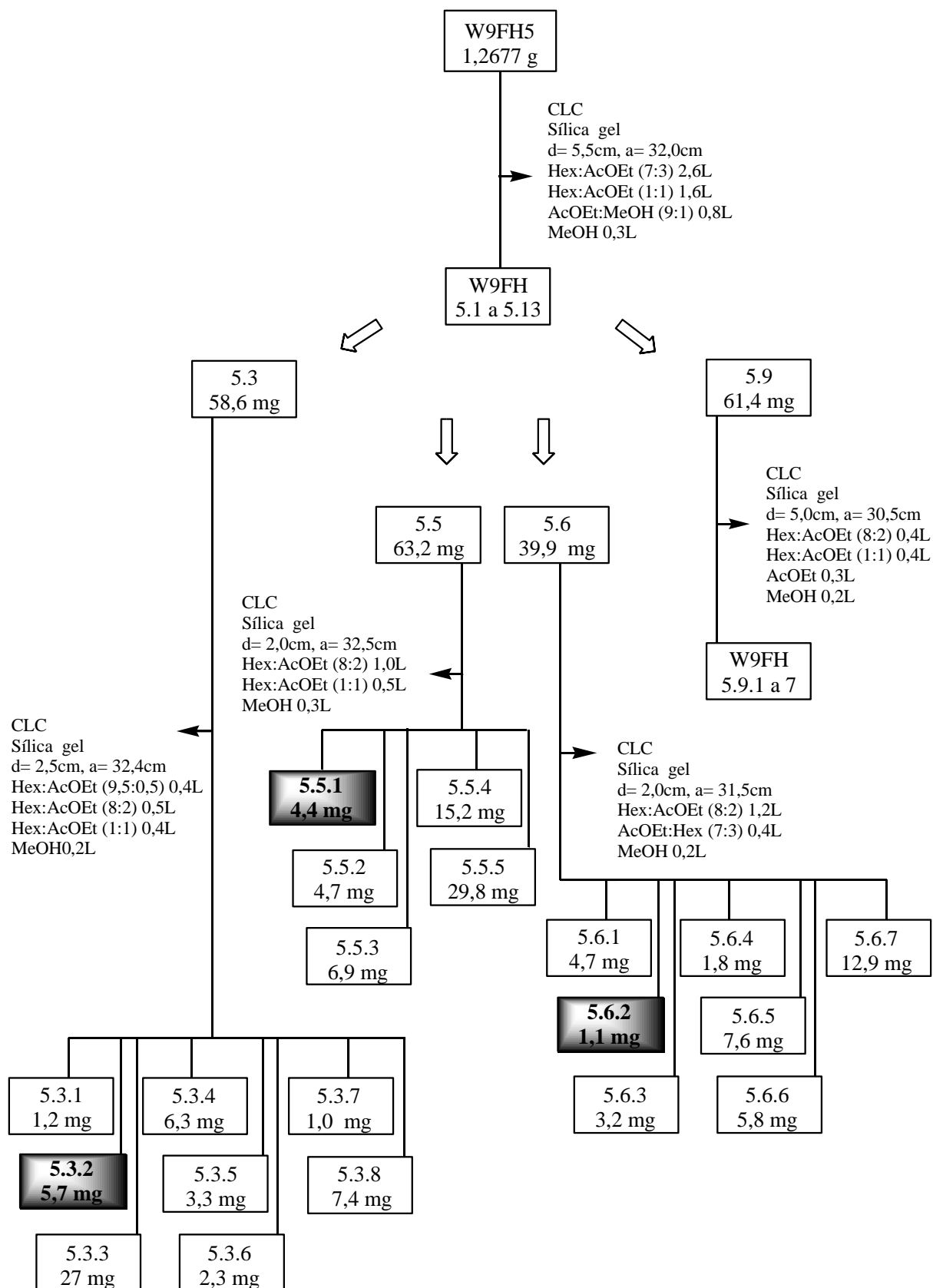


Figura 10. Fracionamento cromatográfico para a fração W9FH5.

3.6 Ensaio de inibição de catepsinas

A determinação da atividade enzimática foi monitorada pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA (Figura 11), gerando MCA (7-amino-metil-cumarina) livre, avaliada diretamente pelo aumento de fluorescência, em função do tempo de reação. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, com volume de 300 μL /poço, mantidas em compartimento termostatzado a 27 °C, sendo a fluorescência detectada em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ e emissão $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

Nos ensaios, foi usado tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA. As enzimas foram utilizadas na concentração estimada de 3 nM, sendo pré-ativadas com DTE 5 mM durante 5 min a 27 °C. Foram, então, incubadas com os extratos ou substâncias isoladas, dissolvidos em DMSO. O controle negativo foi esse próprio solvente, enquanto que o positivo foi feito em presença do inibidor E-64. A determinação da atividade das catepsinas foi realizada por meio do monitoramento da hidrólise do substrato por 5 min.

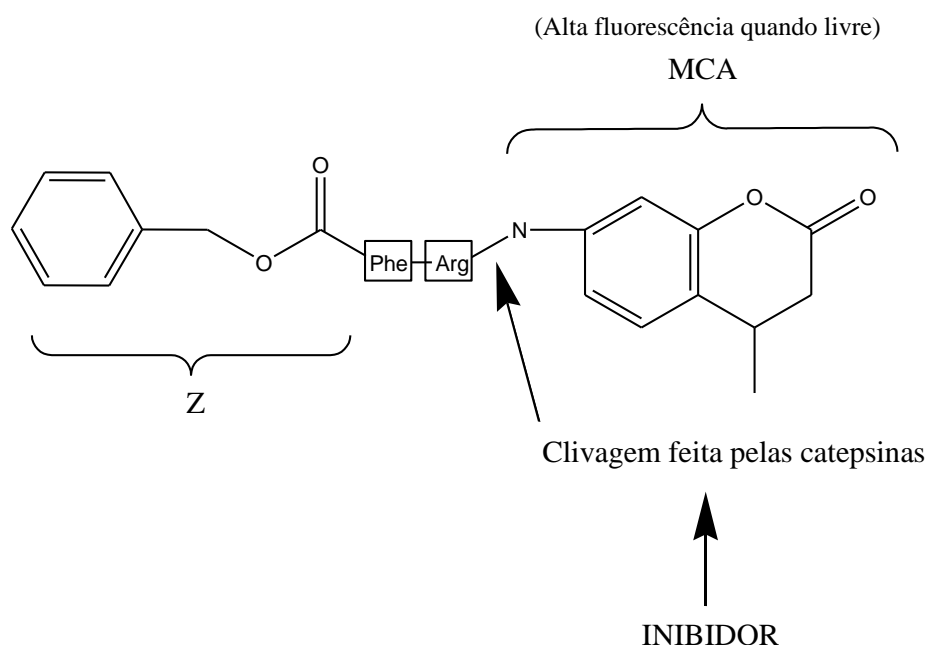


Figura 11. Esquema geral do ensaio enzimático de inibição de catepsinas. Fonte: SEVERINO, 2008 (modificado).

Os resultados são descritos sob a forma de porcentagem de inibição a partir da equação,

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (1 - V_i / V_0);$$

sendo V_i a velocidade de reação observada na presença de inibidor e V_0 a velocidade observada na ausência do inibidor (velocidade controle).

Os extratos foram testados nas concentrações de 500, 250, 125, 50, 25 e 5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os compostos isolados foram ensaiados na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ (%). Os mesmos são considerados ativos quando exibem ao menos 50% de inibição frente às catepsinas testadas.

3.7 Ensaio de inibição de células tumorais

As linhagens celulares do tipo sarcoma-180 foram mantidas em cultura no meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina em estufa com 5% de CO_2 a uma temperatura constante de 37°C .

Após quatro horas de incubação *in vitro* dessas células (2×10^5 células) com o extrato (1 mg/mL) em estudo, em microplacas de 96 poços, 10 μL de uma solução de MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados e a placa de cultura incubada por mais quatro horas. Adicionou-se, então, 50 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% diluído em HCl 0,01 mol/L para solubilização do sal formado e incubou-se por 24 horas em estufa úmida com 5% de CO_2 . Posteriormente, a leitura foi feita em ELISA a 570 nm.

O teste de redução do MTT, descrito por Mosmann (1983), avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato MTT a cristais de formazan, de coloração violeta, na mitocôndria da célula. A quantificação da densidade óptica foi medida em espectrofotômetro e a porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{teste}} / \text{Abs}_{\text{CN}});$$

sendo $\text{Abs}_{\text{teste}}$ a absorvância da preparação com o extrato em teste e Abs_{CN} , do controle negativo (apenas reagentes) .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados os estudos químico e biológico/bioquímico a partir das folhas de *Pachystroma longifolium*.

De forma inicial, os extratos foram avaliados frente às catepsinas e células tumorais, sendo que resultados promissores foram encontrados no primeiro teste. Posteriormente, foi realizado o estudo químico no intuito de identificar e/ou isolar metabólitos secundários a partir dos extratos. Por fim, as substâncias isoladas foram ensaiadas no teste de inibição de catepsinas.

4.1 Avaliação dos extratos quanto à inibição de catepsinas

O extrato bruto e as respectivas partições foram testados frente às catepsinas K, L e V. Os valores estão expostos nos gráficos da Figura 12.

Para a catepsina L, as taxas mais representativas foram provenientes da fração acetato de etila, onde houve uma inibição de 70% das enzimas em uma concentração de 125 µg/mL. Por sua vez, para catepsina K, os resultados mais significativos corresponderam aos extratos provenientes das partições (hexânica e acetato de etila), especialmente para a fração mais polar.

Notou-se que mais promissores foram os resultados obtidos frente à catepsina V. Enquanto o extrato bruto apresentou considerável porcentagem de inibição nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL, os extratos hexânico e acetato de etila mantiveram respostas bastante satisfatórias em concentrações bem menores (50 µg/mL e 25 µg/mL). Especificamente, a fração acetato de etila apresentou maiores porcentagens de inibição em praticamente todas as concentrações testadas.

Pelo fato de essas enzimas estarem sendo consideradas alvos terapêuticos tão promissores, ao ponto de acumularem grandes investimentos por parte das companhias farmacêuticas (KUESTER, LIPPERT, ROESSNER *et al*, 2008), o estudo de inibição de catepsinas é um ramo promissor da terapêutica para combate de uma série de doenças.

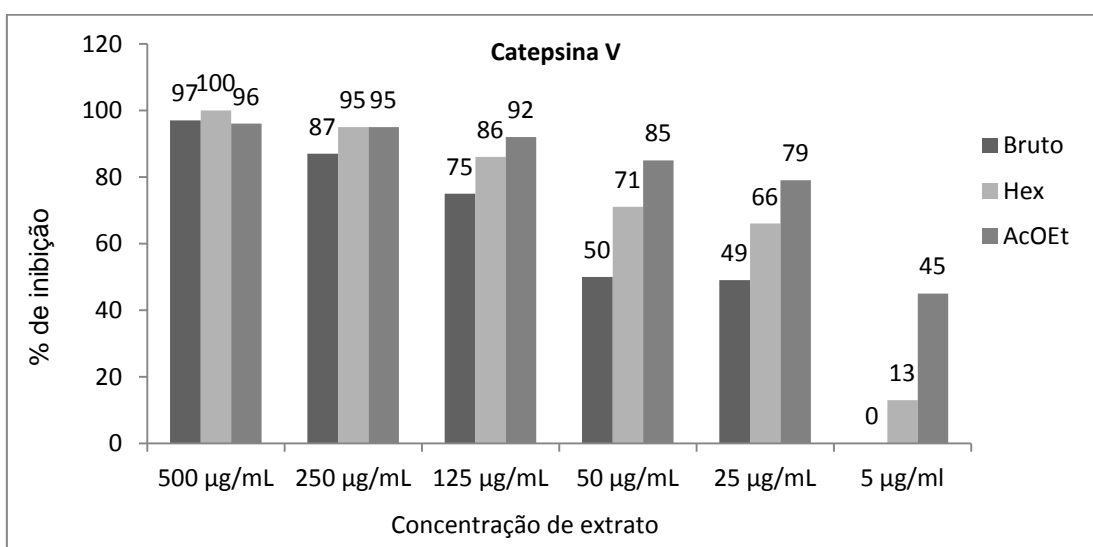
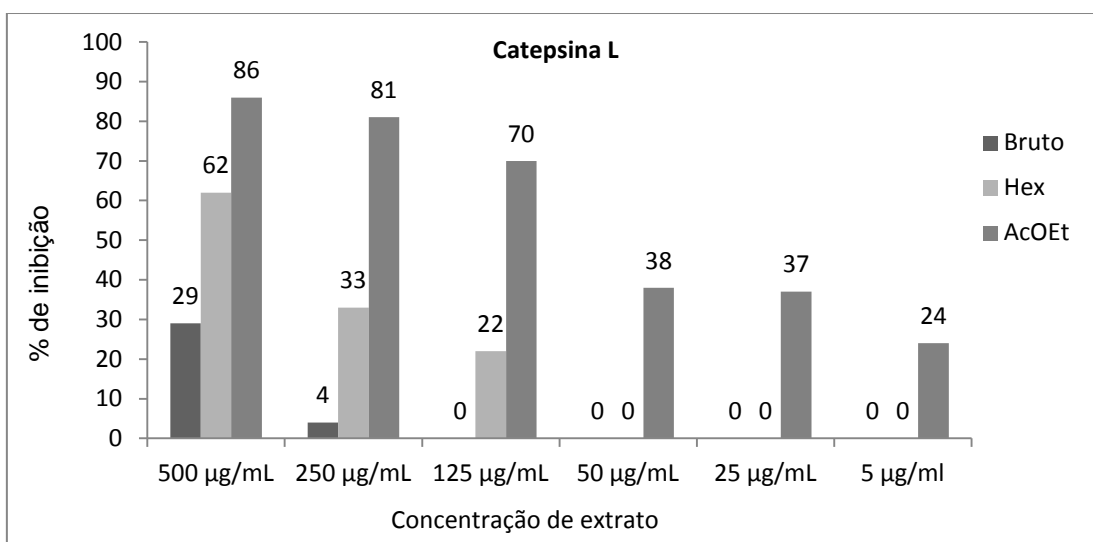
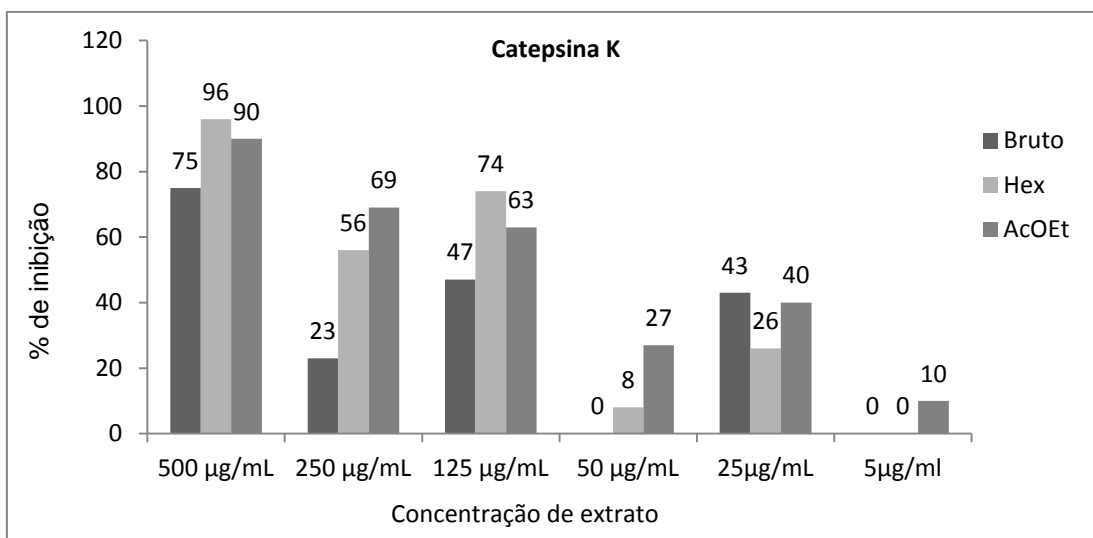


Figura 12. Ensaios de inibição de catepsinas K, L e V, respectivamente.

4.2 Avaliação do extrato bruto quanto à inibição de células tumorais

Realizou-se o ensaio do extrato bruto frente a células de sarcoma-180, na concentração de 1 mg/mL, e encontrou-se uma viabilidade celular de 65,48%, sendo, portanto, o extrato considerado inativo; visto que não causou a morte de pelo menos 50% das células testadas.

4.3 Contaminação por ftalatos e presença de derivados de clorofila

Ésteres do ácido ftálico, também chamados de ésteres ftálicos ou ftalatos (Figura 13), são amplamente empregados como plastificantes para aumentar a flexibilidade e a viabilidade de materiais plásticos em geral (ESTEVES, BORGES, ABRANTE *et al*, 2007). No estudo de produtos naturais, não é incomum a presença desses compostos como contaminantes devido à utilização de solventes, comportados em tonéis plásticos, para os procedimentos de extração e separação/isolamento de metabólitos secundários.

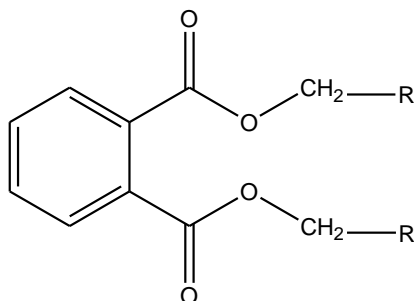


Figura 13. Estrutura química geral de um ftalato.

A presença de ftalatos nas frações deste trabalho foi descoberta quando, posterior à separação efetuada por CCDP, algumas amostras provenientes de W9FA5.4 e 5.5, as quais aparentavam estar puras após a análise por CCDC, foram enviadas para análise por RMN de ^1H (Figura 14).

Os espectros apresentaram dois sinais característicos entre δ_{H} 7,70-7,40 ppm (m), atribuídos aos pares de hidrogênios equivalentes do anel aromático da estrutura do ftalato (Figura 13), e um sinal aproximadamente em δ_{H} 4,20 ppm, referente aos hidrogênios do grupamento $-\text{OCH}_2-$ também presentes (COHEN, CHARRIER, SARFATY, 1991).

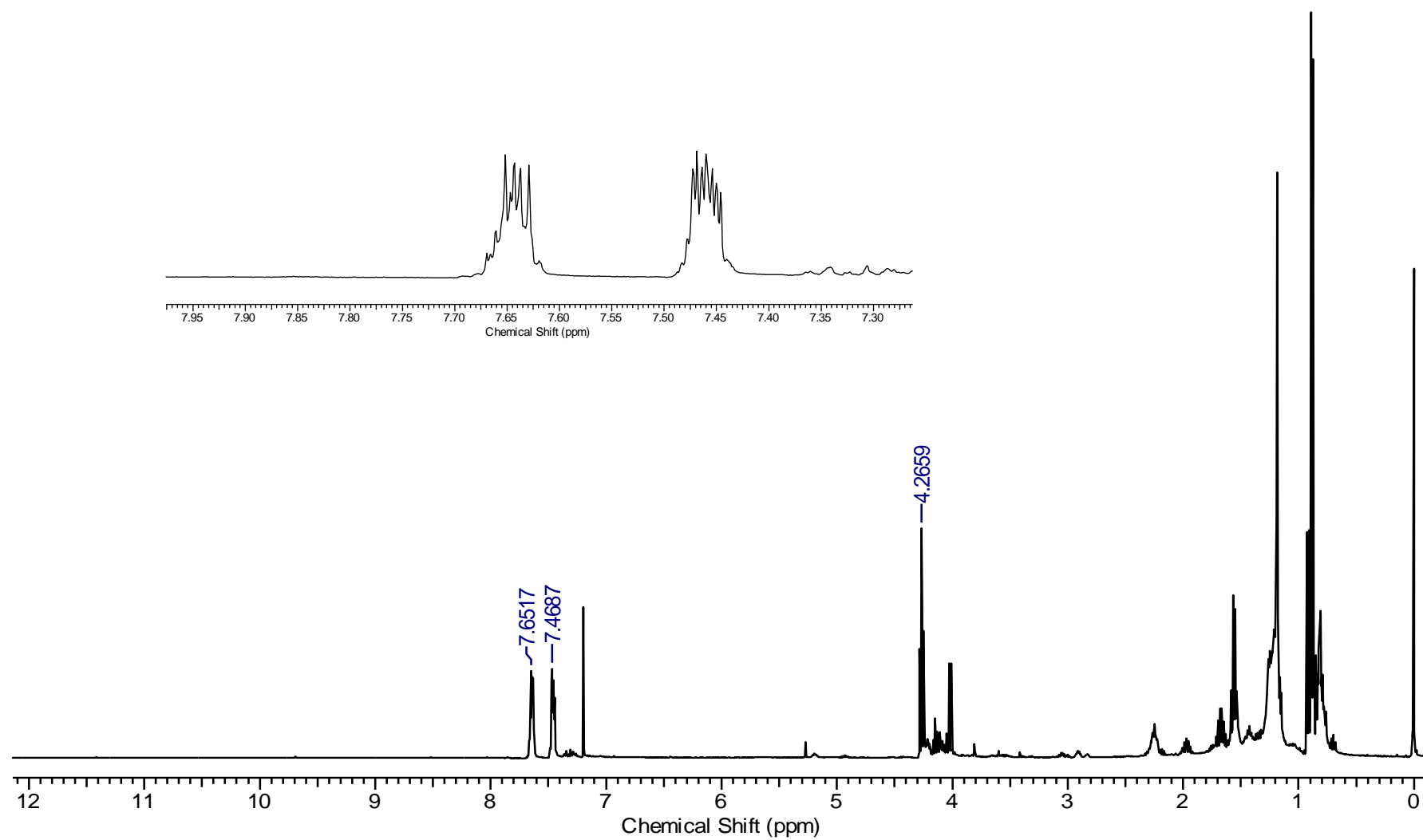


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H destacando sinais de ftalato (CDCl_3 , 400 MHz).

Por sua vez, clorofilas (Figura 15) são pigmentos verdes encontrados em plantas que absorvem luz visível, a qual é então convertida em energia química potencialmente usada no processo de fotossíntese. Estudos em uma grande variedade de plantas caracterizaram que os pigmentos clorofilianos são os mesmos. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devido à presença de outros pigmentos associados e/ou derivados, como os carotenoides, os quais sempre acompanham as clorofilas (VON ELBE, 2000, STREIT, CANTERLE, CANTO *et al*, 2005).

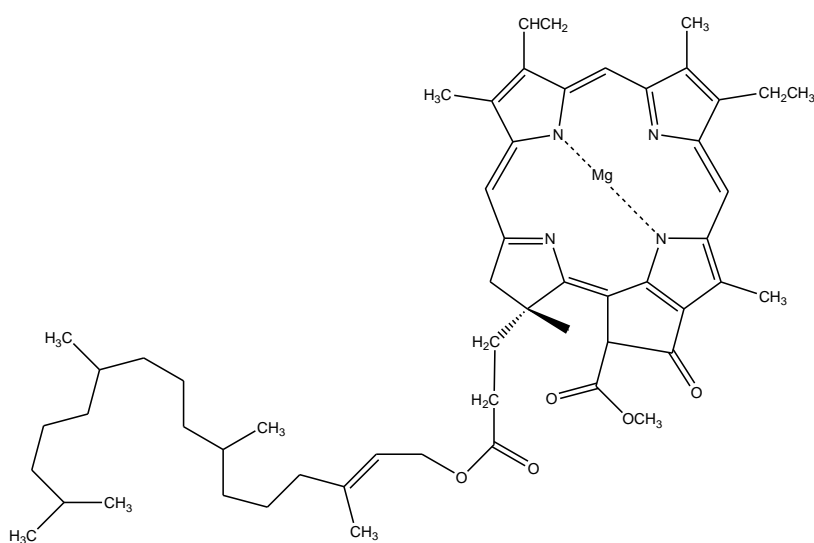


Figura 15. Estrutura química da clorofila tipo “a”.

A presença de derivados de clorofila nas amostras foi definida a partir da análise de espectros de RMN de ^1H (Figura 16), feitos em CDCl_3 ou acetona- D_6 , que exibiam sinais característicos dessas estruturas na região entre δ_{H} 8,0-10,0 ppm (s) e também entre δ_{H} 3,0-4,0 ppm (s) (OCAMPO, CALLOT, ALBRECHT *et al*, 1984).

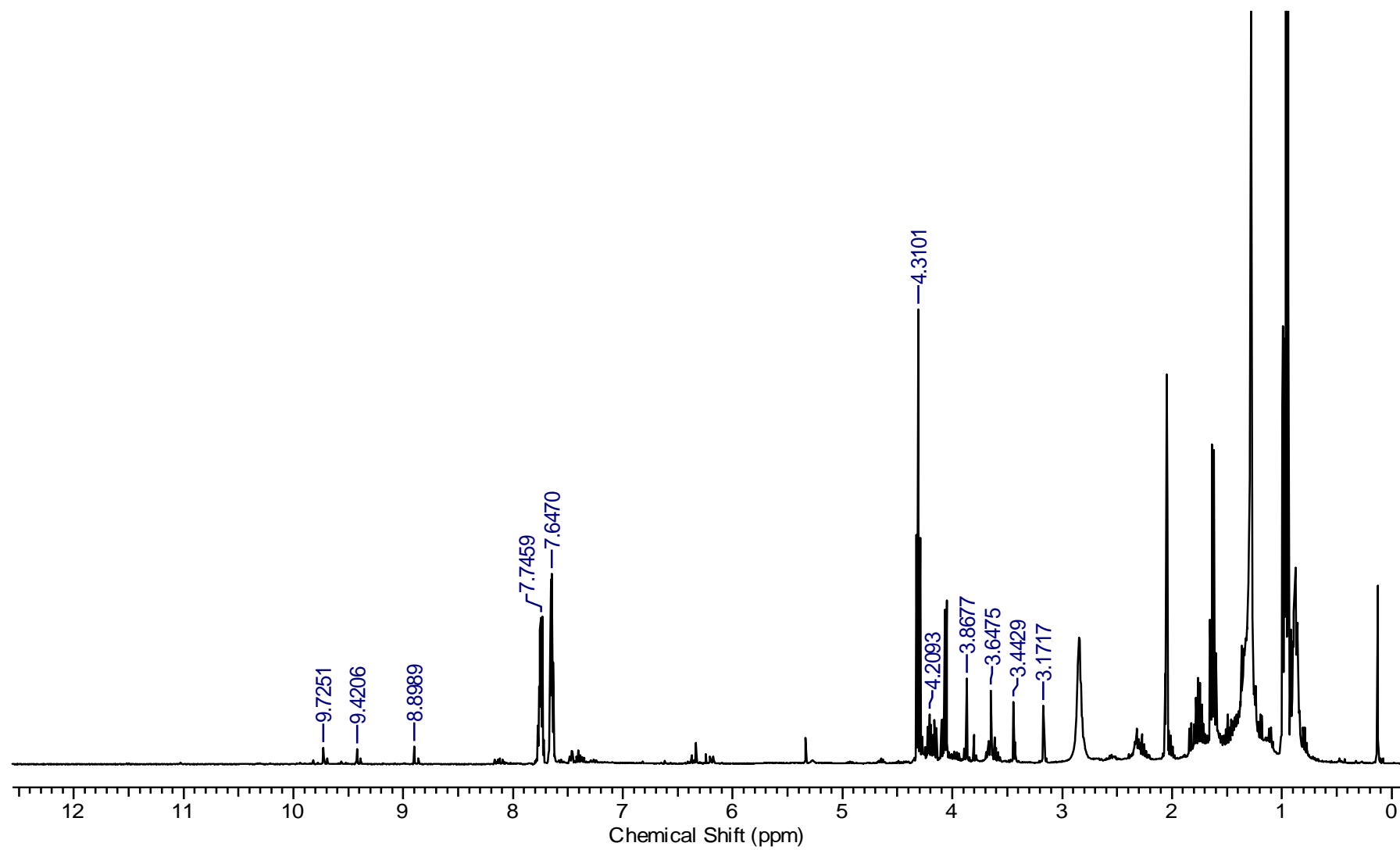


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H destacando sinais de clorofila e de ftalato (acetona- D_6 , 400 MHz).

A partir disso, os perfis químicos dessas amostras, que continham ftalatos e derivados de clorofila, compostos não objetivados neste estudo, foram individualmente feitos em CLAE de fase normal e reversa; nas condições já descritas na página 32 (adotadas para todas as análises do trabalho). Por meio de comparação dos cromatogramas analíticos com os resultados obtidos nos espectros de RMN ^1H , foi possível correlacionar as bandas correspondentes a cada um dos compostos. Por conseguinte, facilmente tais componentes puderam ser identificados em outras subfrações do estudo, acelerando e direcionando o estudo para aquelas amostras consideradas mais relevantes; no âmbito de identificação/isolamento de metabólitos secundários.

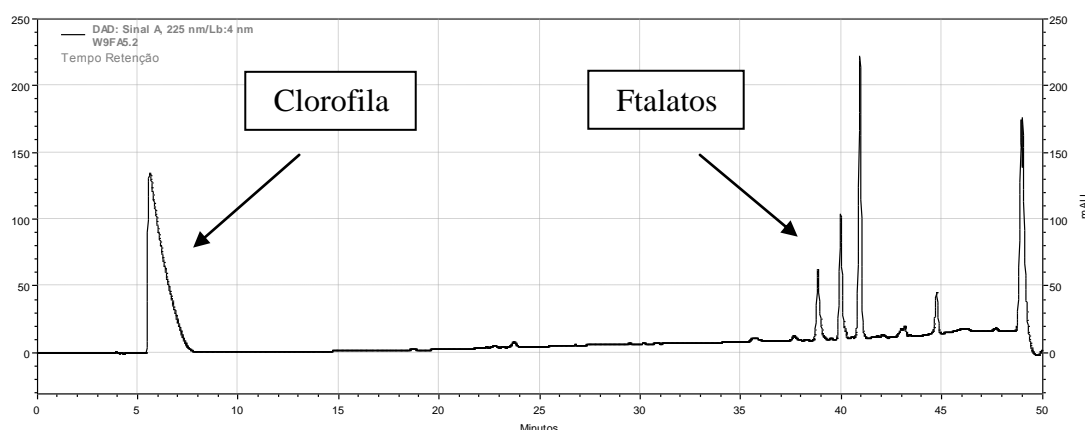


Figura 17. Cromatograma analítico de fase reversa (225 nm) demonstrando as bandas correspondentes à clorofila e ftalatos.

Nos perfis cromatográficos, utilizando CLAE de fase reversa (Figura 17), por exemplo, os ftalatos sempre apareciam apresentando o padrão assinalado na figura, além de tempo de retenção iniciando em aproximadamente 37 minutos. Já a presença de derivados de clorofila foi reconhecida, separadamente e também por comparação com os resultados dos espectros de RMN ^1H , pelo sinal entre 5-6 minutos e pelo seu espectro de UV (Figura 18).

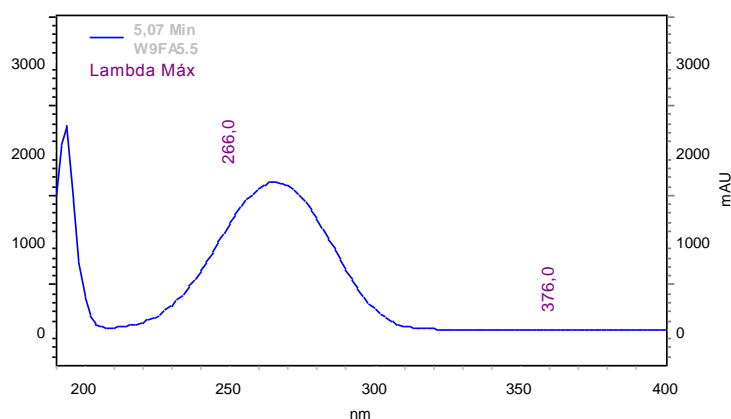


Figura 18. Espectro na região do UV dos derivados de clorofila.

Infelizmente, a grande presença de ftalatos inviabilizou alguns processos cromatográficos e a identificação e/ou isolamento de possíveis metabólitos que se encontrariam em pequenas quantidades nas amostras. Observou-se interferência tanto no extrato hexânico como no acetato de etila, contudo principalmente neste último. Após análise dos solventes utilizados, associou-se à contaminação ao AcOEt utilizado inicialmente para a produção do extrato bruto e para os procedimentos de partição.

4.4 Resultados para o fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (W9FA)

As análises e os resultados gerais encontrados para as frações e subfrações trabalhada são expostos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados para amostras da fração AcOEt.

Fração / Subfração	Análises	Resultados
W9FA1	Solubilidade em Hex, AcOEt, CHCl ₃ , MeOH e DMSO	Não foi solúvel. Não foi possível continuar o estudo.
Subfrações a partir de W9FA2, W9FA3 e W9FA4	CLAE analítica de fase normal e/ou reversa	Além de ftalatos e derivados de clorofila, não apresentaram bandas com absorção no UV.
	CCDC	Não houve resolução satisfatória.
	RMN ¹ H	Presença de ftalatos e derivados de clorofila.

W9FA2.10 (cristais)	Solubilidade em Hex, AcOEt, CHCl ₃ , MeOH e DMSO	Não foi solúvel. Não foi possível continuar o estudo.
W9FA5.1, 5.2, 5.5 e 5.6	RMN de ¹ H	Presença de ftalatos e derivados de clorofila.
W9FA5.3 e 5.4	CCDP	Identificação de contaminantes
Subfrações a partir de W9FA5.7	CLAE analítica de fase reversa	W9FA5.7.4 e 5.7.5 selecionadas para CLAE semi-preparativa de fase reversa
	CCDC	Não houve resolução satisfatória.
W9FA6.1	RMN de ¹ H	Presença de ftalatos.
Subfrações a partir de W9FA6.2	CLAE analítica de fase reversa	W9FA6.2.2 e 6.2.3 selecionadas para CLAE semi-preparativa de fase reversa
Subfrações a partir de W9FA6.3	CLAE analítica de fase reversa	Cromatograma pouco resolvido.
	CCDC	Não houve resolução satisfatória (arraste).
W9FA6.4 e 6.6	CLAE analítica de fase reversa	Cromatograma pouco resolvido.
	CCDC	Não houve resolução satisfatória (arraste).
W9FA6.5	CLAE semi-preparativa de fase reversa	Não houve substâncias puras.
	RMN de ¹ H	
Subfrações a partir de W9FA7	CLAE analítica de fase reversa	W9FA7.1, 7.4 e 7.7 selecionadas para CLAE semi-preparativa de fase reversa
Subfrações a partir de W9FA8 e W9FA9	CLAE analítica de fase reversa	Cromatograma pouco resolvido.
	CCDC	Não houve resolução satisfatória (arraste).
W9FA10	Solubilidade em Hex, AcOEt, CHCl ₃ , MeOH e DMSO	Não foi solúvel. Não foi possível continuar o estudo por CLC ou CLAE.

Por sua vez, mais alguns resultados específicos foram encontrados:

- W9FA4.4 apresentou um cromatograma bem resolvido na análise por CLAE de fase reversa (Figura 19). Procedeu-se com o fracionamento no sistema semi-preparativo, contudo, após envio das quatro subfrações coletadas (indicadas no cromatograma) para análise por RMN de ^1H , os espectros não mostraram substâncias puras.

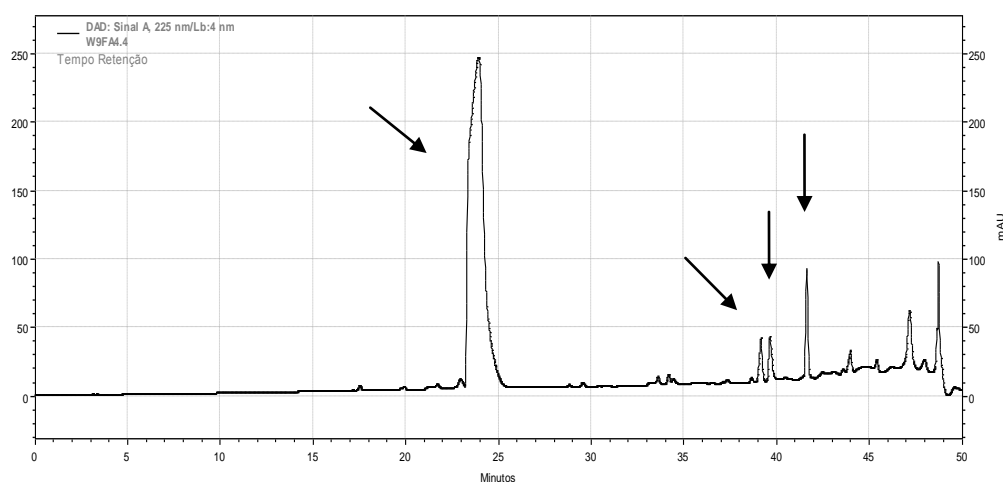


Figura 19. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (225 nm) para a subfração W9FA4.4.

- Após a separação em CLAE semi-preparativa de fase reversa das subfrações W9FA5.7.4 e 5.7.5, oito bandas foram coletadas (Figura 20) e conseguiu-se o isolamento da substância loliolida (**1**); assinalada nos cromatogramas das Figuras 20 e 21.

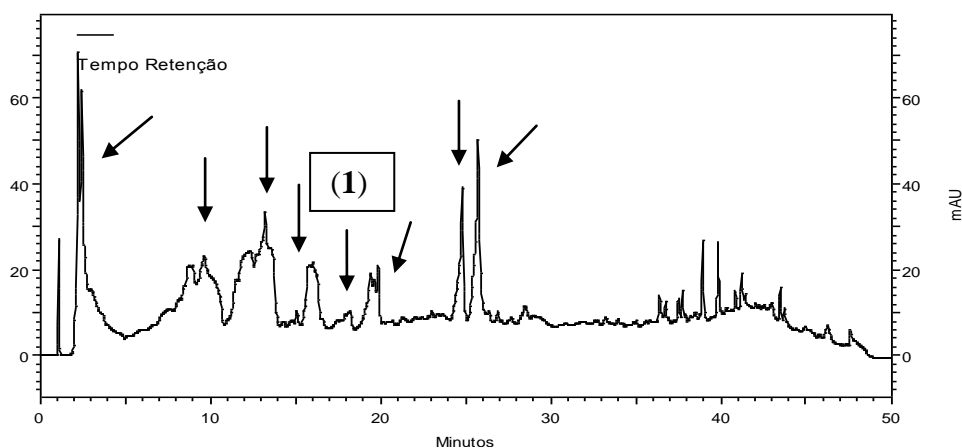


Figura 20. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (267 nm) para a subfração W9FA5.7(4,5).

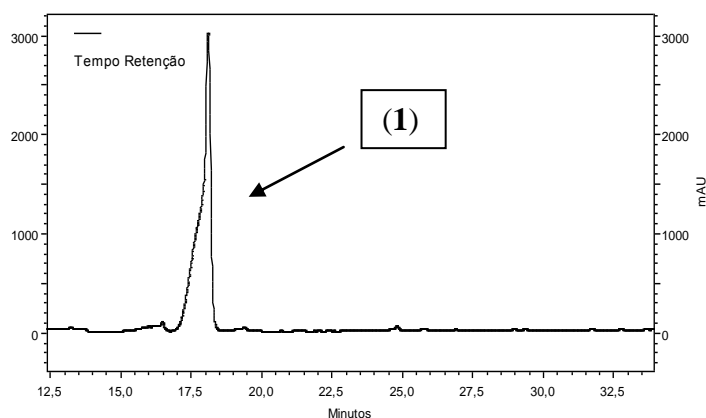


Figura 21. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (218 nm) para a subfração W9FA5.7(4,5).

- Das subfrações W9FA6.2.2 e 6.2.3, que foram encaminhadas para CLAE semi-preparativa de fase reversa, conseguiu-se o isolamento do galato de etila (**2**) a partir dessa última (Figura 22). Sendo que as demais subfrações recolhidas não apresentaram substâncias puras na análise dos espectros de RMN de ^1H .

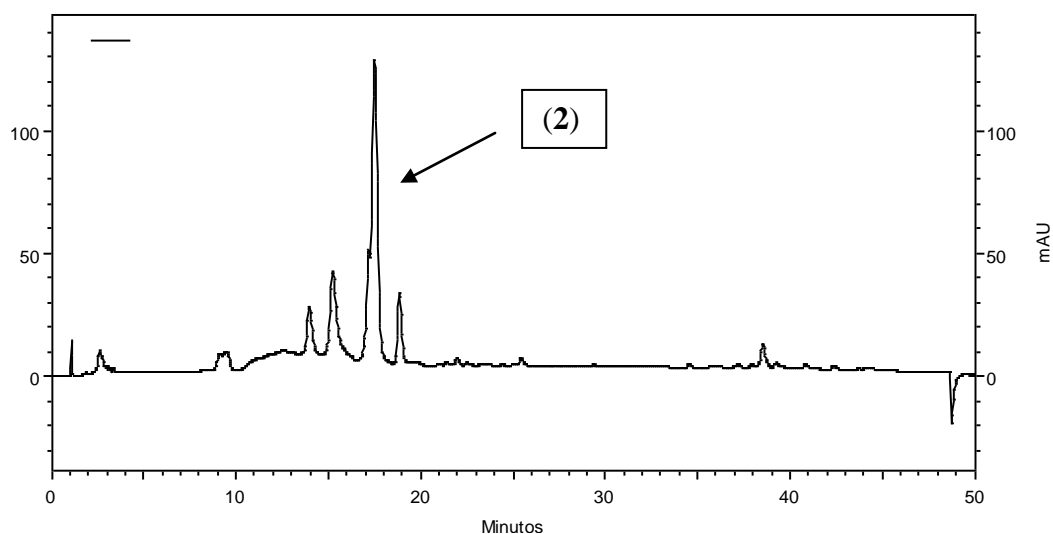


Figura 22. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (331 nm) para a subfração W9FA6.2.3.

- A subfração 7.4, após CLAE semi-preparativa de fase reversa, rendeu o isolamento de duas substâncias, assinaladas na Figura 23: ácido gálico (**3**) e protocatecuato de metila (**4**).

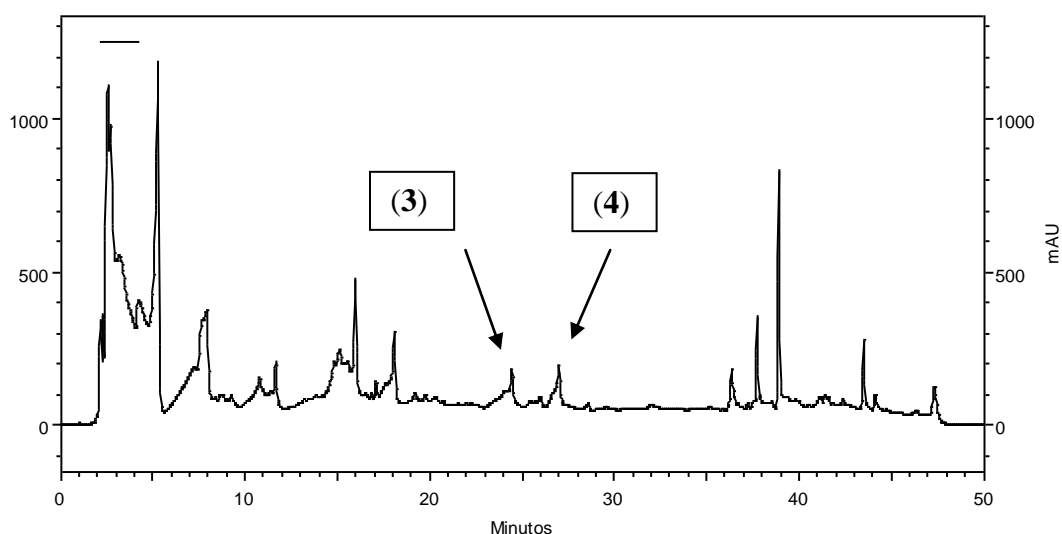


Figura 23. Cromatograma semi-preparativo de fase reversa (225 nm) para a subfração W9FA7.4.

4.5 Resultados para o fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (W9FH)

- Frações W9FH1 e W9FH4: no espectro de RMN ^1H (CDCl_3), observaram-se sinais destacando apenas para a presença de ftalatos e derivados de clorofila. Ao mesmo tempo em que, nas placas de CCDC, a inexistência de um perfil adequadamente resolvido para novos procedimentos cromatográficos por CLC.
- Fração W9FH2/3: devido a grande quantidade de massa e a semelhança das frações 2 e 3, quando analisadas por CCDC e pelos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3), decidiu-se reuni-las e seguir com uma separação por CLV.
 - Após análise das sete subfrações resultantes do procedimento inicial, W9FH2.5 e 2.6 foram escolhidas para novos processos cromatográficos. As demais subfrações não apresentaram um perfil resolvido em CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - Todas as subfrações geradas a partir de W9FH2.5 e 2.6 foram analisadas por CCDC e CLAE analítica de fase normal. daquelas que foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H (CDCl_3) e CG-EM, nenhuma resultou em algum composto isolado ou identificado.

- Fração W9FH5: após realização da CLC inicial, os resultados das análises por CCDC e CLAE analítica indicaram como amostras mais interessantes para seguimento do trabalho: W9FH5.3, 5.5, 5.6 e 5.9. Tais subfrações foram submetidas, individualmente, à separação cromatográfica em coluna convencional.
 - De todas as subfrações resultantes, analisadas por CCDC e CLAE de fase normal, as amostras W9FH5.3.1, 5.3.2, 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3, 5.6.2, 5.6.4, 5.9.1 e 5.9.2 foram direcionadas para análise por RMN de ^1H (CDCl_3) e CG-EM.
 - Na subfração W9FH5.5.1, foi identificada uma mistura de α -amirina (**5**), β -amirina (**6**) e lupeol (**7**).
 - Em W9FH5.3.2, identificou-se a substância β -amirina (**6**) em mistura com outros compostos não identificados.
 - Também o esteroide sitosterol (**8**) foi identificado na subfração W9FH5.6.2.
 - Nas demais subfrações não houve identificação e/ou isolamento de compostos.
- Fração W9FH6: a amostra foi fracionada por CLC utilizando sílica gel e as subfrações geradas foram submetidas às análises por CCDC e CLAE analítica de fase normal.
 - Não se obteve nenhum metabólito puro ou ao menos identificado.

Fração W9FH7: apresentou difícil solubilidade em MeOH e arraste em CCDC,

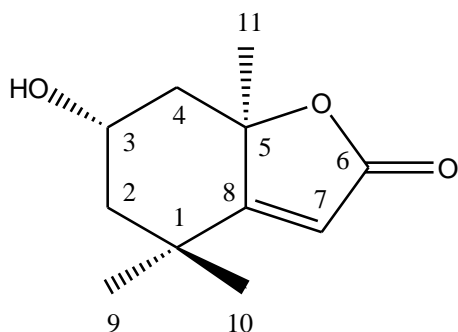
- Optou-se por não trabalhar com tal fração.

4.6 Substâncias identificadas e/ou isoladas

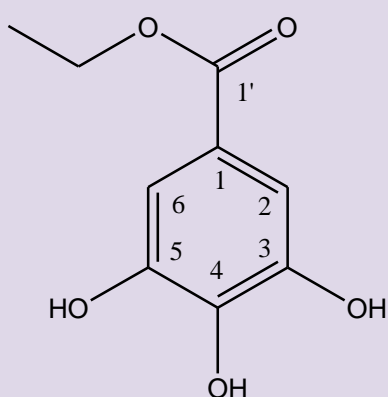
Os procedimentos cromatográficos detalhados levaram ao isolamento das substâncias: loliolida (**1**), galato de etila (**2**), ácido gálico (**3**) e protocatecuato de metila (**4**).

Houve também a identificação dos tepernos: α -amirina (**5**), β -amirina (**6**) e lupeol (**7**); e do esteroide sitosterol (**8**).

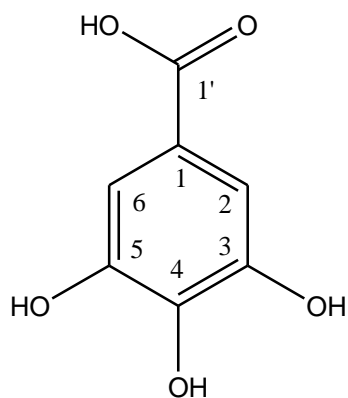
Tabela 4. Substâncias isoladas a partir da fração acetato de etila.



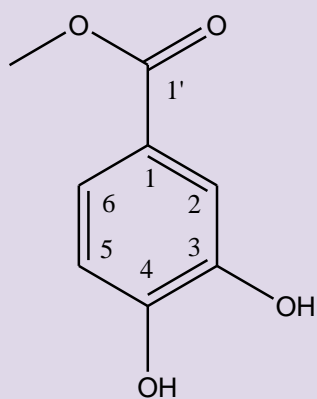
Substância 1: Loliolida
Isolamento: Pág. 39
Elucidação: Pág. 63



Substância 2: Galato de etila
Isolamento: Pág. 40
Elucidação: Pág. 71

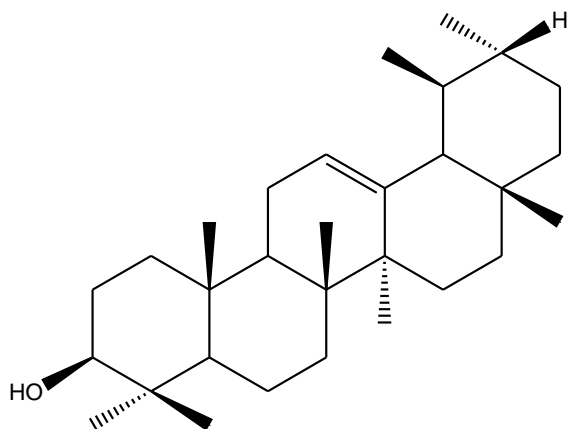


Substância 3: Ácido gálico
Isolamento: Pág. 41
Elucidação: Pág. 67

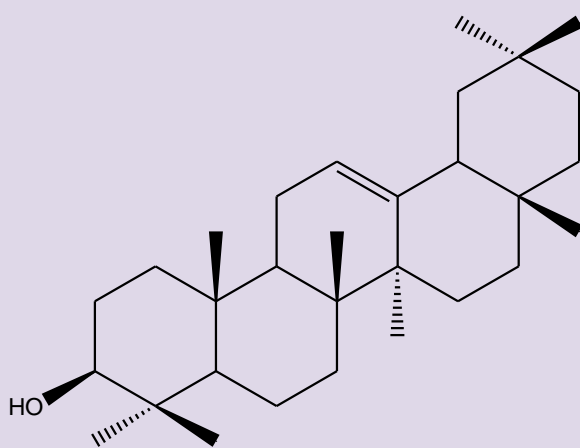


Substância 4: Protocatecuato de metila
Isolamento: Pág. 41
Elucidação: Pág. 73

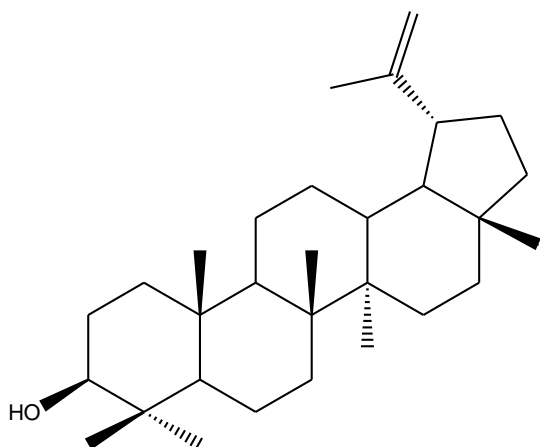
Tabela 5. Substâncias identificadas a partir da fração hexânica.



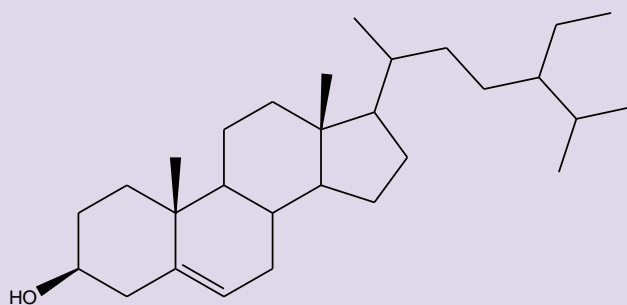
Substância **5**: α -amirina
Identificação: Pág. 45 e 81



Substância **6**: β -amirina
Identificação: Pág. 45 e 81



Substância **7**: Lupeol
Identificação: Pág. 45 e 81



Substância **8**: Sitosterol
Identificação: Pág. 45 e 83

4.7 Determinação estrutural

4.7.1 Substância 1

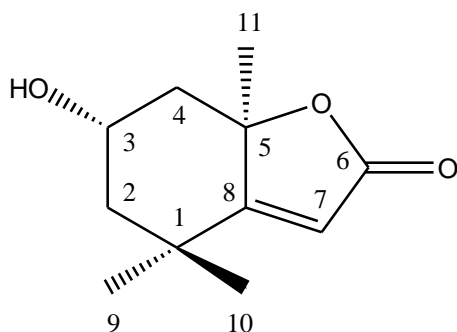


Figura 24. Estrutura química da loliolida (1).

Isolado do extrato AcOEt na forma de um sólido amarelado (2,1 mg), o composto foi identificado como loliolida (Figura 24) devido à comparação dos dados provenientes dos espectros obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 25 e 26) com a literatura (KIM, LEE, MOON *et al*, 2004, HONG, WANG, HSU *et al*, 2011, RÉJON, RODRÍGUEZ e STERNER, 2009); inclusive pertencente a outra espécie da própria família em estudo (Tabela 6) (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2002).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) obtidos para loliolida (1) e comparados com a literatura (*) (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2002) (δ em ppm, J em Hz).

Posição	^1H (1)	^1H (*)	^{13}C (1)	^{13}C (*)
1	-	-	35,9	36,0
2	1,96 (dt, $J = 14,0$ e $2,7$)	1,98 (dt, $J = 14,4$ e $2,7$)	47,3	47,2
	1,52 (dd, $J = 14,0$ e $3,5$)	1,53 (dd, $J = 14,4$ e $3,5$)		
3	4,32 (quint, $J = 3,5$)	4,33 (quint, $J = 3,5$)	66,8	66,8
4	2,46 (dt, $J = 14,0$ e $2,7$)	2,46 (dt, $J = 14,0$ e $2,7$)	45,6	45,5
	1,77 (dd, $J = 14,0$ e $3,5$)	1,79 (dd, $J = 14,0$ e $3,5$)		
5	-	-	86,6	86,9
6	-	-	182,3	182,6
7	5,68 (s)	5,70 (s)	112,9	113,0
8	-	-	171,8	171,0
9	1,26 (s)	1,27 (s)	30,6	30,6
10	1,45 (s)	1,47 (s)	26,4	26,4
11	1,77 (s)	1,78 (s)	26,9	27,0

No espectro de RMN de ^1H (Figura 25), foi observado um sinal em δ_{H} 5,68 ppm (s), relativo ao hidrogênio olefínico da estrutura (H-7), e um sinal com deslocamento químico de δ_{H} 4,32 ppm (quint, $J = 3,5$ Hz), referente ao hidrogênio oximetínico (H-3).

Observaram-se também sinais para dois grupos metilênicos em δ_{H} 2,45 ppm (1H, dt, $J = 14,0$ e $2,7$ Hz, H-4 β), 1,96 ppm (1H, dt, $J = 14,0$ e $2,7$ Hz, H-2 β), 1,77 ppm (1H, dd, $J = 14,0$ e $3,5$ Hz, H-4 α) e 1,52 ppm (1H, dd, $J = 14,0$ e $3,5$ Hz, H-2 α). Os três grupamentos metila apareceram em δ_{H} 1,77 ppm (CH₃-11), 1,45 ppm (CH₃-10) e 1,26 ppm (CH₃-9).

As orientações alfa e beta dos átomos de hidrogênio foram concluídas por comparação com os dados relatados na literatura (HONG, WANG, HSU *et al*, 2011).

Os sinais em 1,77 e 1,52 ppm, caracterizados como duplo dubletos, são devido ao acoplamento geminal ($J = 14,0$ Hz) e ao acoplamento vicinal ($J = 3,5$ Hz) que os átomos de hidrogênio H-4 α e H-2 α possuem. Por sua vez, os sinais em 2,45 e 1,96 ppm, representados por duplo tripletos, são assim dispostos devido aos hidrogênios H-4 β e H-2 β possuírem os acoplamentos geminal e vicinal, mas, adicionalmente, também acoplarem entre si com $J = 2,7$ Hz. O sinal, que teoricamente, deveria se caracterizar por um duplo duplo dubleto (ddd), mostra-se como duplo tripleto provavelmente pelo fato de seus traços centrais aproximarem-se bastante; de acordo com os valores das constantes de acoplamento .

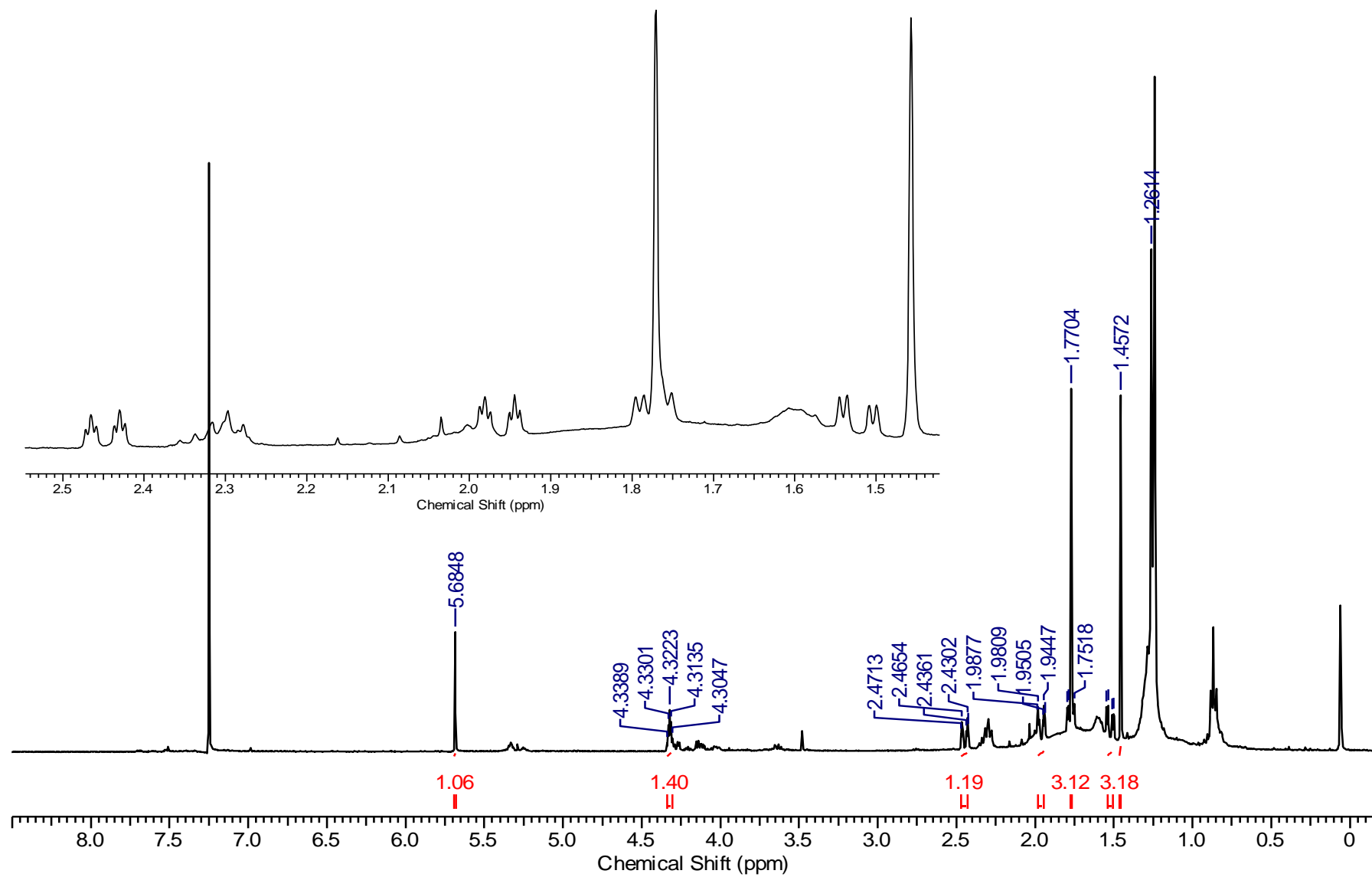


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H da loliolida (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26), a unidade lactônica α,β -insaturada foi evidenciada pelos sinais em δ_{C} 182,3 (C-6), 171,8 (C-8) e 112,9 ppm (C-7). Os demais carbonos da molécula exibiram valores de: δ_{C} 86,6 (C-5), 66,8 (C-3), 47,3 (C-2), 45,6 (C-4), 35,9 (C-1), 30,6 (C-11), 26,9 (C-10) e 26,4 ppm (C-9).

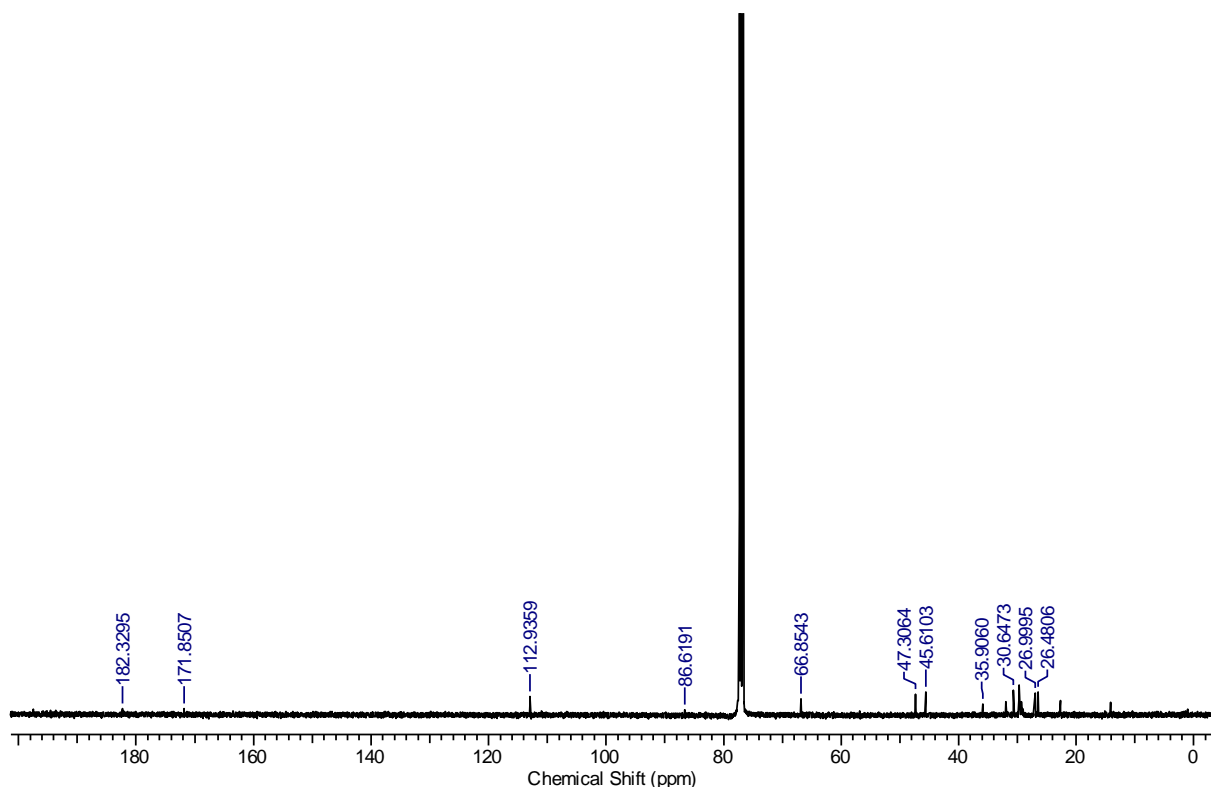


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C da lolilida (CDCl_3 , 100 MHz).

A confirmação estrutural deu-se pelo resultado encontrado no espectro de massas (Figura 27), realizado em modo negativo $[\text{M-H}]^-$, com a presença do sinal m/z 195,1. A substância apresenta massa calculada de 196,11 e fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ (YANG, KANG, LEE *et al*, 2011).

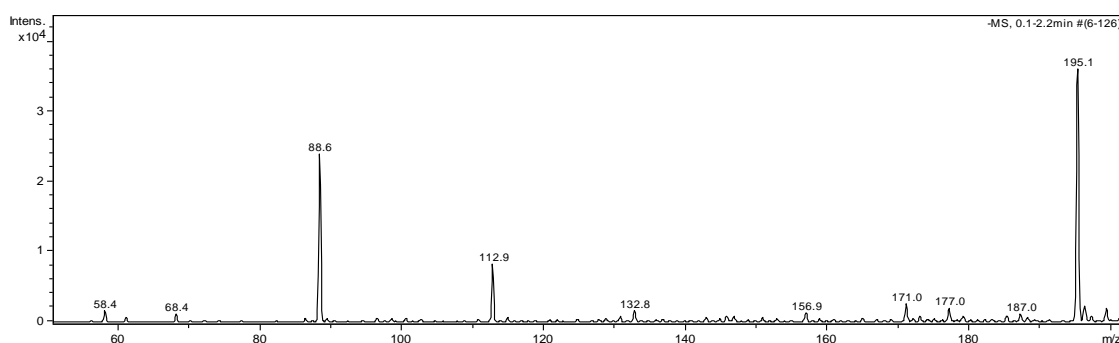


Figura 27. Espectro de massas $[\text{M-H}]^-$ para a lolilida.

A loliolida corresponde a uma lactona de origem terpenóide (classe de metabólitos secundários detalhada mais a frente) e já foi isolada de várias plantas (HODGES e PORTE, 1964, YANG, KANG, LEE *et al*, 2011, GHOSAL, SINGH, CHAUDHURI, 1976). Contudo há poucas publicações em Euphorbiaceae, sendo que os dois primeiros relatos na família são das espécies *Alchornea glandulosa* (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2002) e *Pera glabrata* (CARDOSO-LOPES, DE PAULA, BARBO *et al*, 2009). Também é encontrada em organismos marinhos, como algas (KIMURA e MAKI, 2002, PERCOT, YALCIN, AYSEL *et al*, 2009) e moluscos (PETTIT, HERALD, ODE *et al*, 1980).

Dentre as atividades biológicas relatadas para essa substância, têm-se ação repelente, e imunossupressiva e citotóxica contra carcinoma de nasofaringe e leucemia linfóide (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2002). A substância também já foi testada quanto a suas capacidades antioxidante e protetora de células contra o processo de apoptose e apresentou resultado satisfatoriamente positivo (YANG, KANG, LEE *et al*, 2011).

4.7.2 Substâncias 2 e 3

O composto (**3**), um sólido amorfo amarelo (3,1 mg) proveniente da fração AcOEt, foi inicialmente isolado e então identificado como ácido gálico (Figura 28).

Sua elucidação estrutural deu-se por meio do espectro de RMN de ^1H (Figura 29), o qual apresentou um sinal em δ_{H} 7,03 ppm (s), referente aos dois hidrogênios equivalentes (H-2 e H-6) do anel aromático da molécula, quando comparado à literatura (SANTANA, SARTORELLI, LAGO *et al*, 2012).

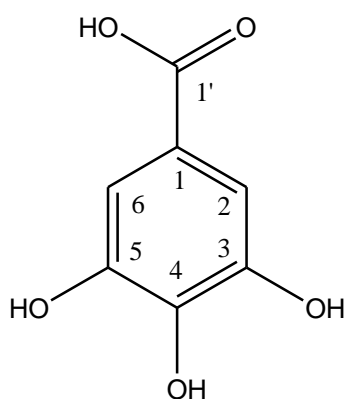


Figura 28. Estrutura química do ácido gálico (**3**).

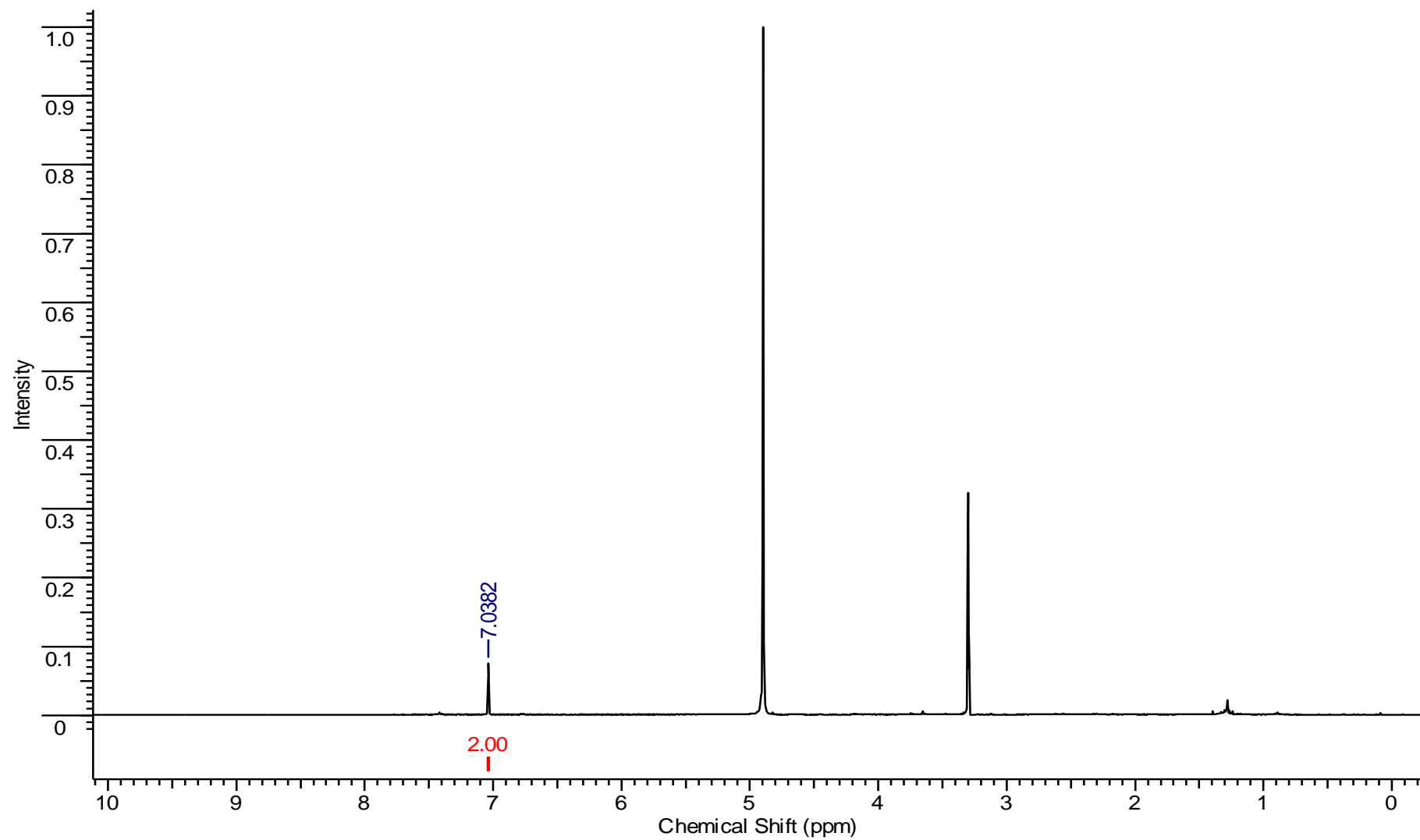


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do ácido gálico (CD_3OD , 400 MHz).

O metabólito apresenta massa calculada de 170,02 e fórmula molecular de $C_7H_6O_5$. A confirmação da estrutura foi possível devido à presença do sinal m/z 168,8 no espectro de massas realizado em modo negativo $[M-H]^-$ (Figura 30) (CHENG, ZHANG, LIANG *et al*, 2013).

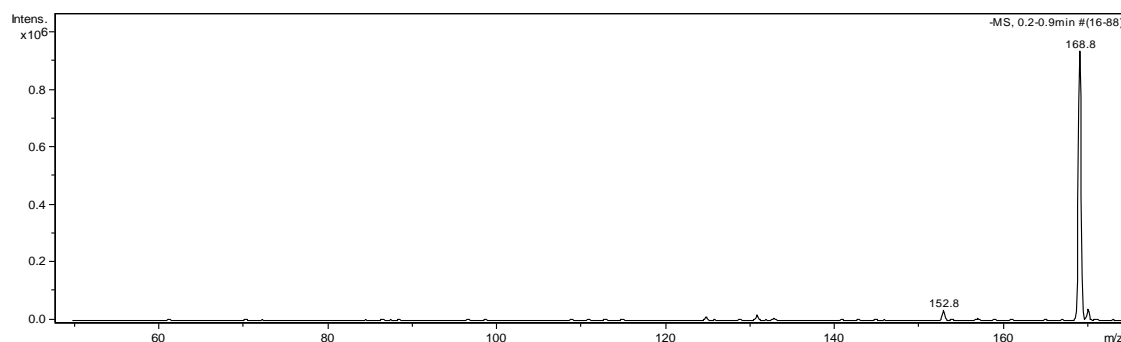


Figura 30. Espectro de massas $[M-H]^-$ para o ácido gálico.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um polifenol muito comum e presente nas mais diversas famílias do reino vegetal; inclusive em muitas espécies de Euphorbiaceae (LIMA M., LIMA J., ARRIAGA *et al*, 2009, LUO, ZHAO, YANG *et al*, 2011). Frequentemente é encontrado na forma livre e também como constituinte de taninos – polifenóis de alto peso molecular; especificamente denominados, neste caso, de galotaninos (Figura 31) (DEWICK, 2002). Ésteres de ácido gálico, também comuns em plantas, são chamados de galatos.

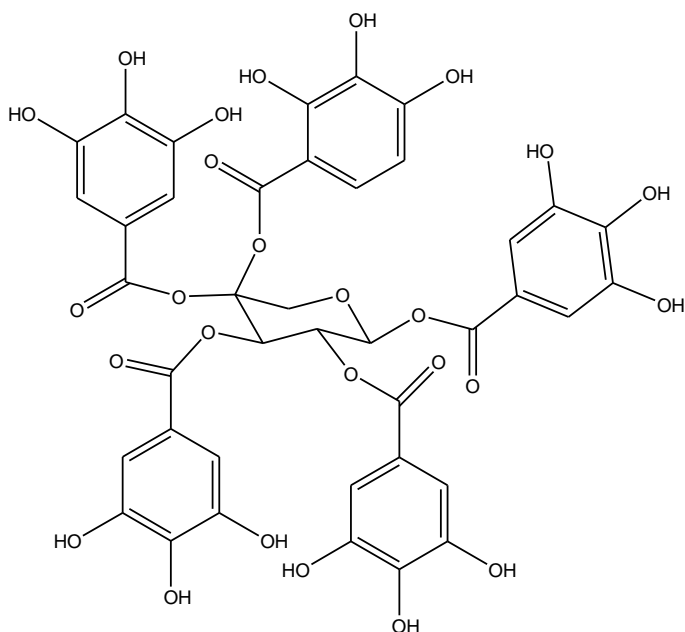


Figura 31. Estrutura química da pentagaloilglicose, exemplo de um galotanino.

Há várias ações biológicas descritas para o ácido gálico, como: citotoxicidade para células de carcinoma e leucemia humanas (LIMA, LIMA, ARRIAGA *et al*, 2009); contribuição para melhora de úlcera gástrica induzida por medicamento (CHATTERJEE, BISWAS, BHATTACHARYA *et al*, 2012); antioxidante (LUO, ZHAO, YANG *et al*, 2011); potencialização de vasoconstrição induzida por outras substâncias, como fenilefrina (SANAE, MIYAICHI, HAYASHI, 2002); atividade antibacteriana e antiparasitária (NAZ, SIDDIQI, RASCOOL *et al*, 2007, EGER, 2010).

Por sua vez, o composto (2) (Figura 32) é um derivado da molécula de ácido gálico, sob a forma de éster etílico.

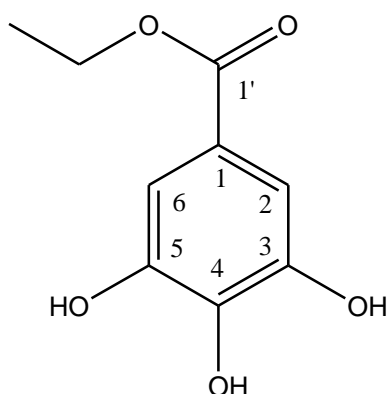


Figura 32. Estrutura química do galato de etila (2).

De uma forma geral, o ácido gálico e seus ésteres são amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica. Estudos mostram que esses ésteres possuem atividades anticancerígena, antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiparasitária, antiinflamatória, dentre outras (EGER, 2010, MURASE, KUME, HASE *et al*, 1999).

Especificamente, o galato de etila, em variados trabalhos, exibiu ações hemolítica e de captura de radicais livres, citotoxicidade (KALAIVANI, RAJASEKARAN e MATHEW, 2011) e atividade antimicrobiana (OOSHIRO, A.; HIRADATE, KAWANO *et al*, 2009).

Essa substância, um sólido amarelado (1,8 mg) proveniente da fração AcOEt, foi identificada como galato de etila (etil 3,4,5-trihidroxibenzoato) por meio de análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 33) e comparação com a literatura (OOSHIRO, HIRADATE, KAWANO *et al*, 2009).

No espectro, foi observado inicialmente um sinal relacionado à região de hidrogênios aromáticos (δ_H 7,03 ppm, s). Correlacionou-se, então, à estrutura do ácido gálico e à possibilidade do composto se tratar de um derivado do mesmo.

O sinal em δ_H 4,26 ppm (2H, quart, $J = 7,1$ Hz) sugeriu a existência de um éster, devido ser compatível com o deslocamento químico de um grupo metilênico ligado a oxigênio. Adicionalmente, o sinal em δ_H 1,33 ppm (t, $J = 7,1$ Hz), referindo-se a um grupamento metila, permitiu elucidação final do composto.

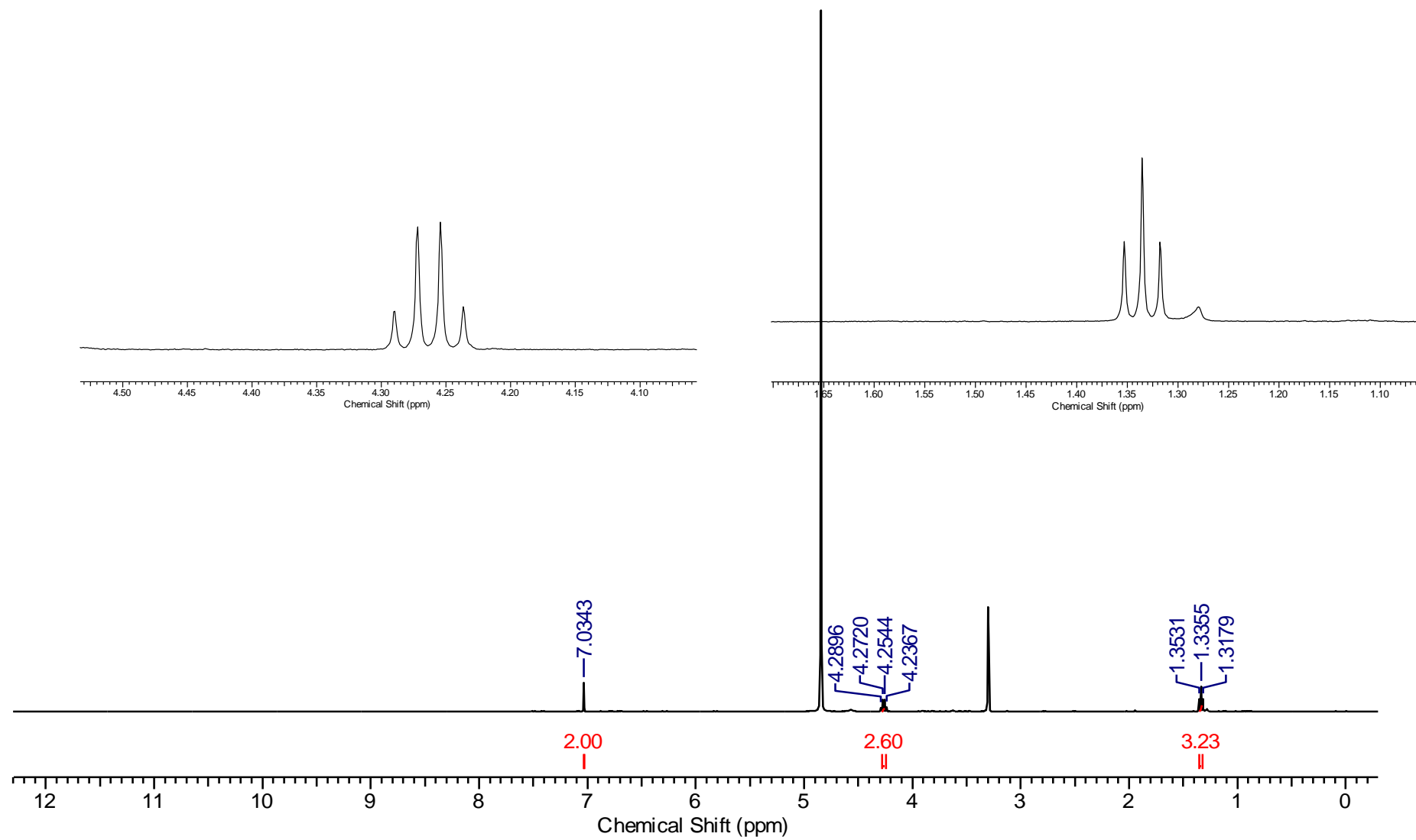


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do galato de etila (CD_3OD , 400 MHz).

O espectro de massas possibilitou a comprovação da molécula com o aparecimento do sinal m/z 196,9 $[M-H]^-$ (Figura 34). O galato de etila apresenta a fórmula molecular $C_9H_{10}O_5$ e massa calculada de 198,05.

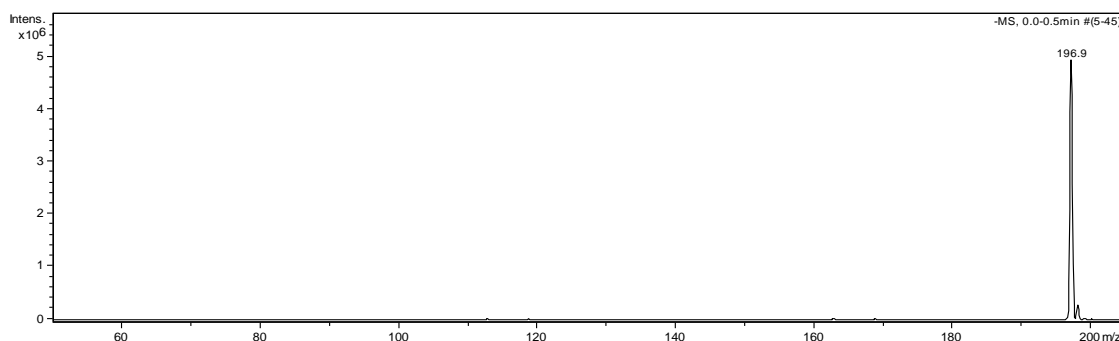


Figura 34. Espectro de massas $[M-H]^-$ para o galato de etila.

4.7.3 Substância 4

O metabólito (**4**) foi isolado como um sólido amarelo (3,9 mg), também da fração AcOEt, e definido como protocatecuato de metila (Figura 35) por análises do espectro de RMN de 1H , mapa de contornos HMBC e espectro de massas, além de comparação com a literatura (RUDIYANSYAH e GARSON, 2006).

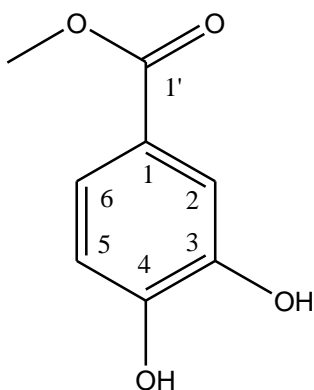


Figura 35. Estrutura química do protocatecuato de metila (**4**).

O espectro de RMN de 1H (Figura 36) exibiu sinais referentes a três hidrogênios aromáticos em δ_H 7,42 ppm (d, $J = 1,6$ Hz), 7,41 ppm (dd, $J = 1,6, 8,0$ Hz) e 6,77 ppm (d, $J = 8,0$ Hz) os quais sugeriram um anel 1,3,4-trissubstituído, devido aos padrões de constantes de acoplamento que demonstraram um sistema aromático do tipo ABX (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al*, 2009). Também se observou um sinal em δ_H 3,65 ppm (s), atribuído à presença de três hidrogênios metoxílicos.

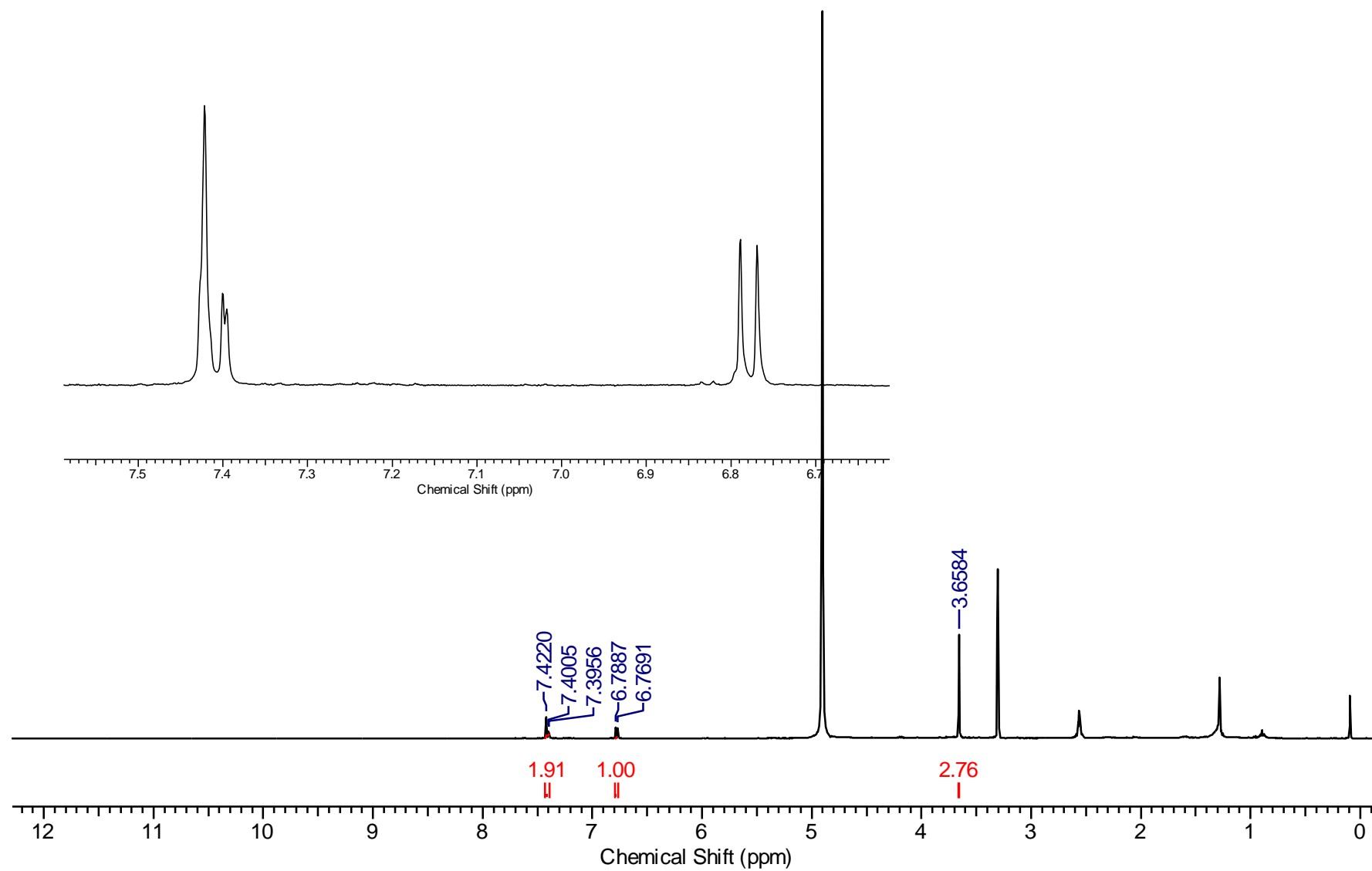


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do protocatecuato de metila (CD_3OD , 400 MHz).

A análise do mapa de contornos HMBC (Figura 37) apresentou correlação importante para a definição da estrutura ao mostrar a reciprocidade entre o sinal dos hidrogênios metoxílicos (δ_H 3,65 ppm) com o sinal referente a um carbono carboxílico (δ_C 174,79 ppm), indicando, portanto, a presença de um éster metílico na estrutura.

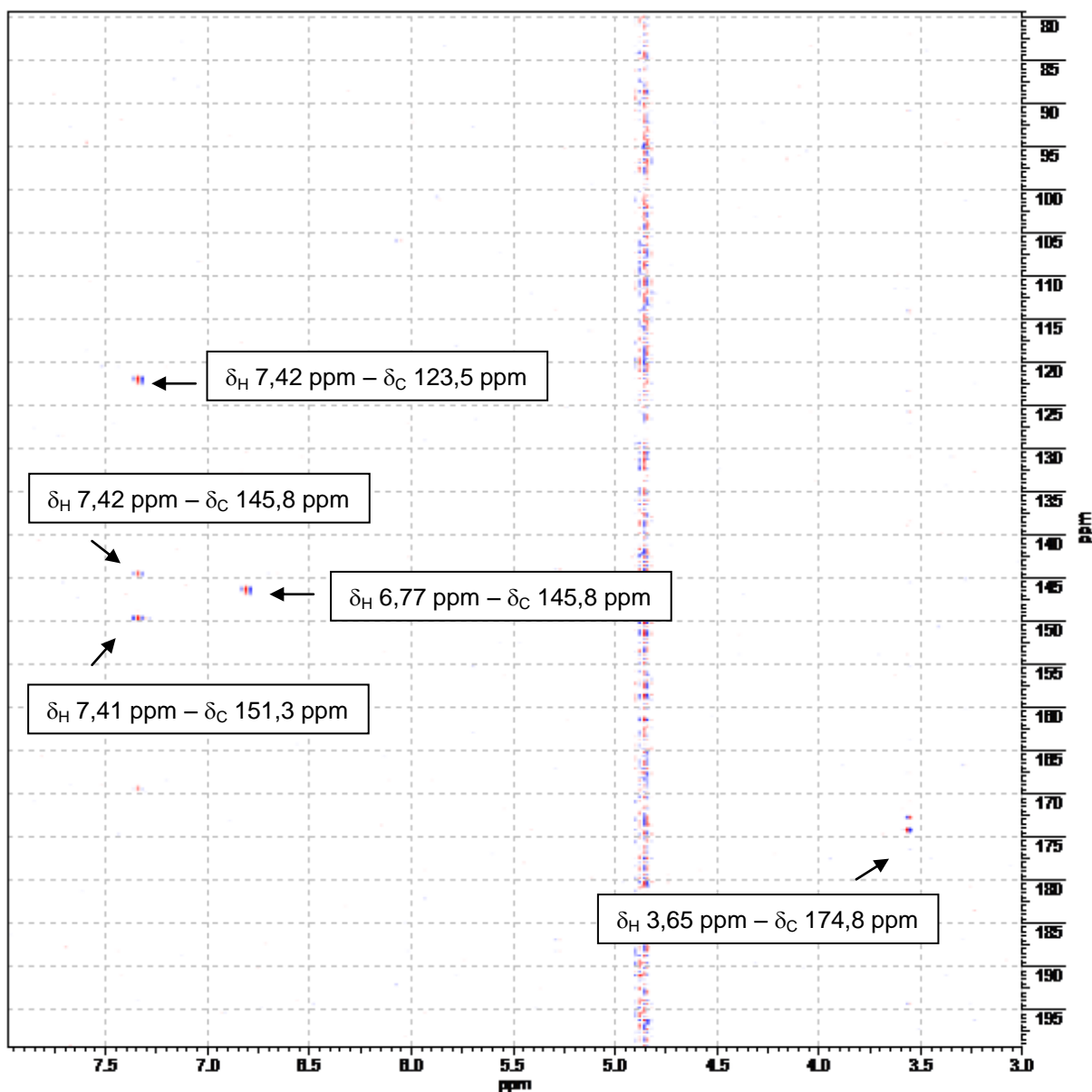


Figura 37. Mapa de contornos HMBC da substância protocatecuato de metila (CD_3OD , 400 MHz).

A partir daí, mais algumas atribuições, quanto aos deslocamentos químicos dos átomos da substância, puderam ser feitas por meio das correlações a duas e três ligações entre átomos de hidrogênio e carbono presentes no HMBC (Figura 38).

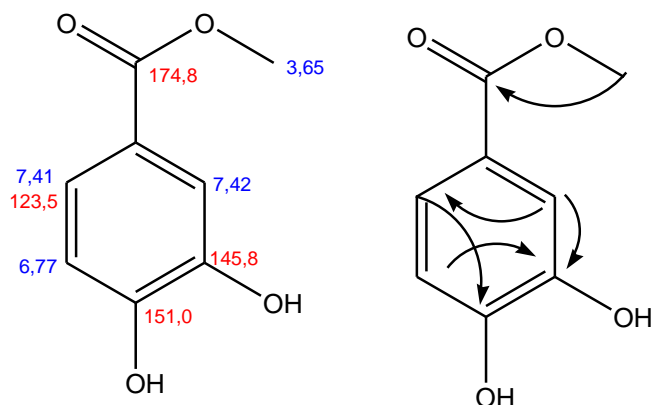


Figura 38. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , e correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância protocatuato de metila.

Dessa forma, os carbonos fenólicos do anel são compatíveis com os deslocamentos químicos de δ_C 151,0 e 145,8 ppm, enquanto que o carbono carboxílico, como já exposto, apresenta-se em δ_C 174,8 ppm. Por sua vez, o C-6 pôde ser atribuído ao valor δ_C 123,5 ppm a partir da correlação com o sinal em 7,42 ppm, referente ao H-2, e das correlações do átomo C-3 (145,8 ppm) com os H-5 e H-6, com os deslocamentos respectivos de 6,77 e 7,41 ppm (Figura 37).

O espectro de massas (Figura 39), em modo positivo $[\text{M}-\text{H}]^+$, demonstrou a presença do sinal m/z 169,1 e comprovou a estrutura do composto, o qual apresenta a fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ e massa calculada de 168,04.

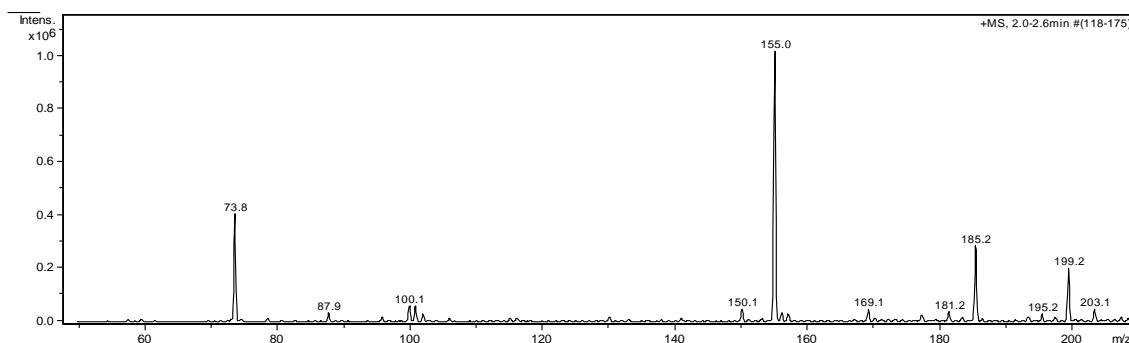


Figura 39. Espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^+$ para o protocatuato de metila.

O metabólito isolado trata-se de um derivado do ácido protocatecuico (Figura 40); substância amplamente distribuída em plantas sob a forma livre ou como constituinte de diversos compostos aromáticos; como gomas e resinas, e derivados de flavonoides e pigmentos (LINK, ANGELL, WALKER, 1929). É relatado por possuir atividade antioxidante acentuada (HYOGO, KOBAYASHI, SAZ *et al*, 2010) e potencial de prevenção do câncer (TANAKA T., TANAKA T., TANAKA M., 2010).

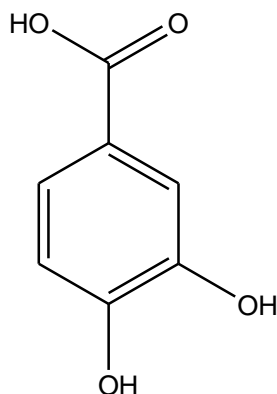


Figura 40. Estrutura química do ácido protocatecuico.

Por sua vez, em trabalhos publicados, o protocatecuato de metila (metil 3,4-dihidroxibenzoato) apresentou certa atividade antiinflamatória e também antioxidante (CHENG, ZHANG, LIANG *et al*, 2013); com potencial para captura de radicais livres (AZIZUDDIN, MAKHMOOR, CHOUDHARY, 2010).

4.7.4 Substâncias 5, 6 e 7

Os compostos α -amirina (5), β -amirina (6) e lupeol (7) são terpenos extremamente comuns e encontrados em todos os tipos de plantas. Na família Euphorbiaceae, também são amplamente distribuídos (MATOS, 2011, REFAHY, 2011, FELIU, 2011).

Os terpenos compõem uma grande família de produtos naturais derivada de unidades C_5 (unidade isoprênica). Imaginava-se que o próprio isopreno (figura 41) estaria envolvido na formação desses compostos, mas atualmente sabe-se que as unidades básicas e ativas para a biossíntese são: dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e isopentenil pifosfato (IPP) (Figura 41). A partir daí, várias estruturas podem ser formadas e modificadas por diversos tipos de reações, originando uma ampla gama de derivados terpenóides (PADUCH, SZERSZEN, TRYTEK, 2007, DEWICK, 2002); como é o caso da própria molécula de loliolida (Figura 24) descrita anteriormente neste trabalho.

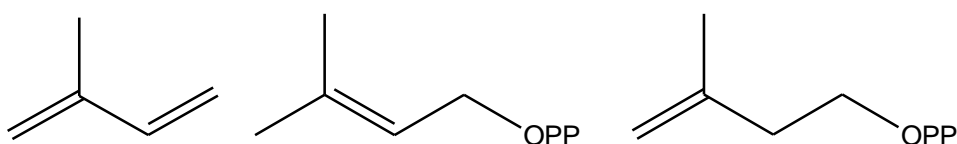


Figura 41. Estruturas do isopreno, DMAPP e IPP, respectivamente.

Dessa forma, por exemplo, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (com dez, quinze e vinte carbonos, respectivamente), são formados por duas, três e quatro unidades isoprênicas. Seguindo a mesma regra, triterpenos são compostos de trinta carbonos. Apresentam diferentes subgrupos; como triterpenos do tipo ursano (α -amirina), oleanano (β -amirina) e lupano (lupeol) (Figura 42) (MATOS, 2011).

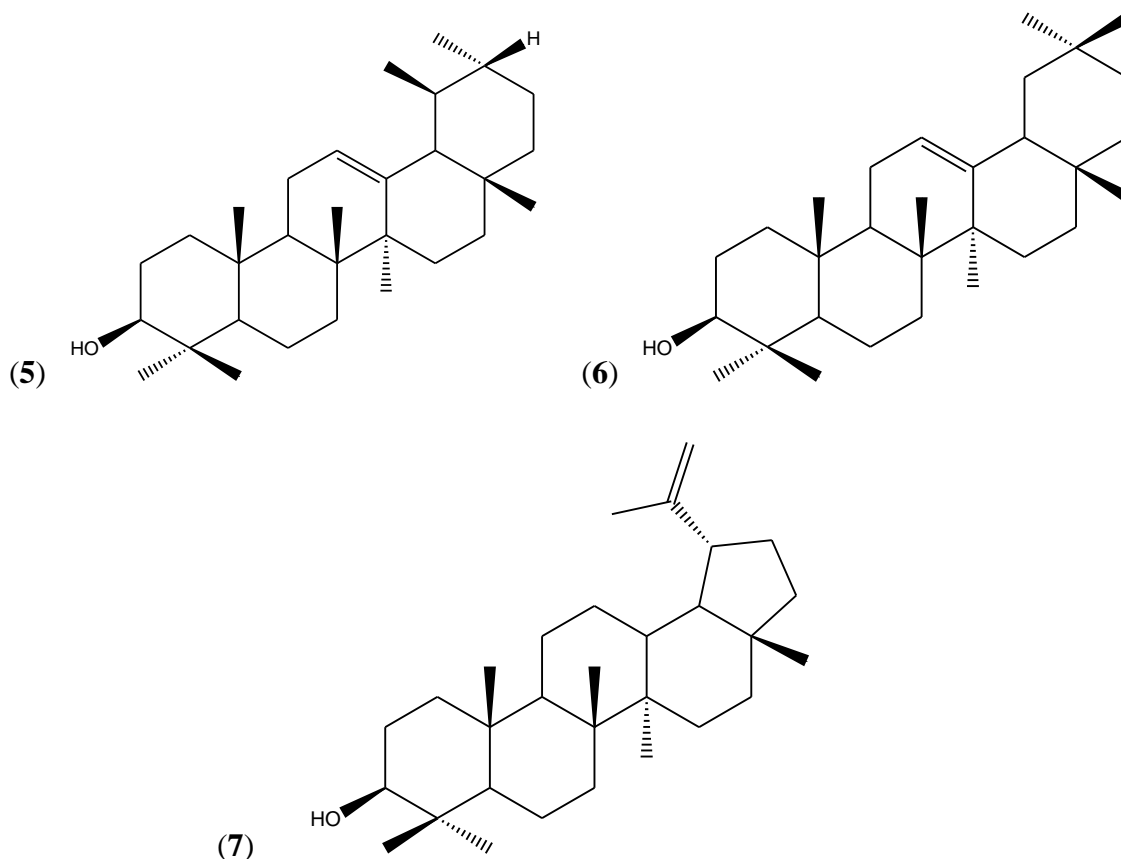


Figura 42. Estruturas químicas da α -amirina (5), β -amirina (6) e lupeol (7).

A identificação desses três metabólitos, presentes nas subfrações de origem hexânica, foi possível devido à comparação dos dados de RMN de ^1H com a literatura (ZANON, PEREIRA, BOSCHETTI *et al*, 2008, MATOS, 2011, CHATURVEDULA, ZHOU, GAO *et al*, 2004) e análise por CG-EM.

No espectro de RMN de ^1H da subfração W9FH5.5.1 (Figura 43), pôde-se observar a presença de todos os três compostos em mistura.

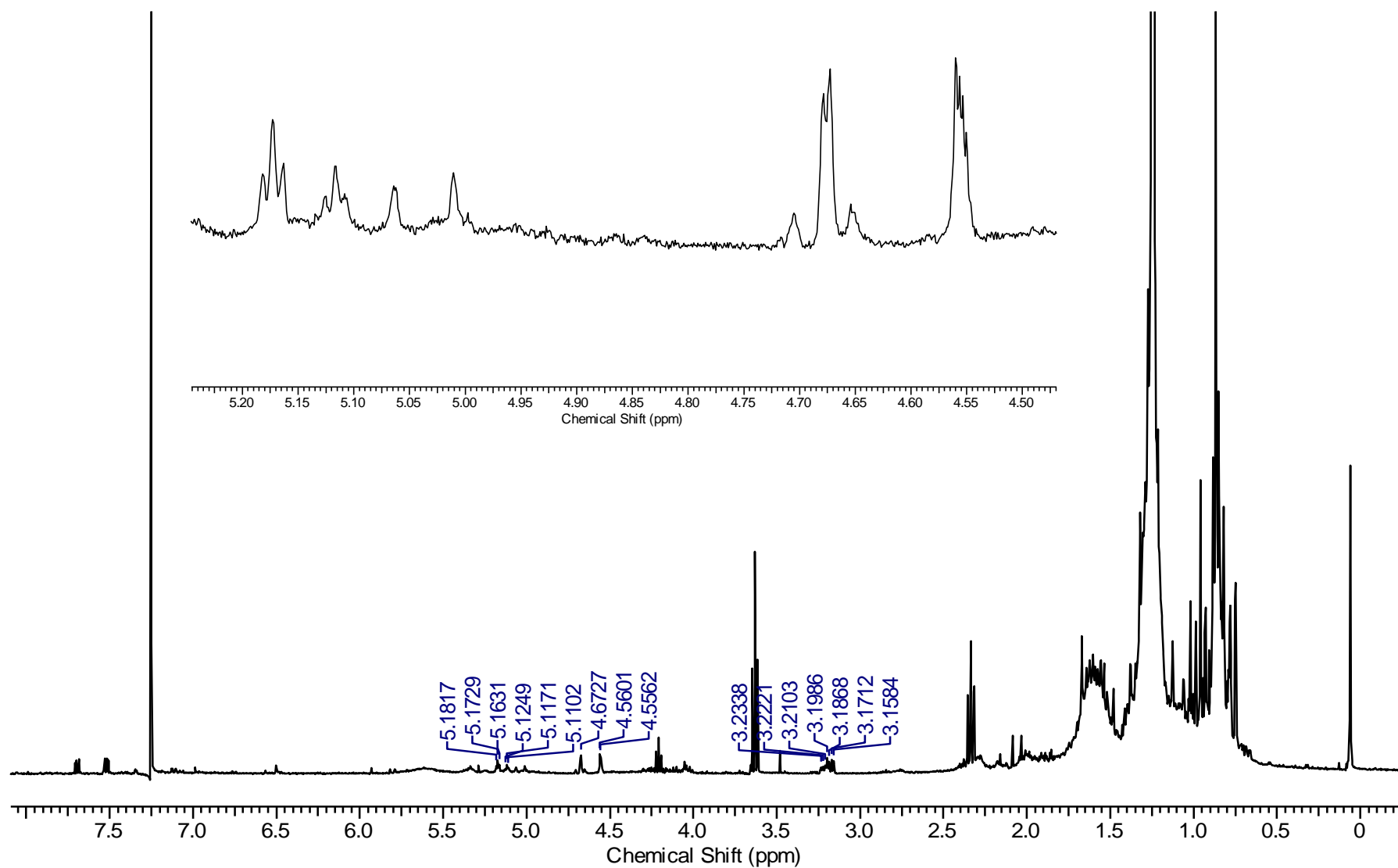


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H para α -amirina, β -amirina e lupeol em mistura (CDCl_3 , 400 MHz).

Os sinais em δ_H 5,17 (t, $J = 3,5$ Hz) e 5,12 ppm (t, $J = 3,2$ Hz) foram compatíveis com os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio olefínico da β -amirina e α -amirina, respectivamente. Enquanto isso, a presença do lupeol foi sugerida pelos sinais em δ_H 4,67 (d, $J = 2,4$ Hz) e 4,56 ppm (dd, $J = 2,4$ e 1,6 Hz), relacionados aos átomos de hidrogênio olefínicos geminais da molécula (Figura 42). Por sua vez, o multiplete na região de δ_H 3,20 ppm representa os hidrogênios oximetínicos que as três substâncias possuem em sua estrutura química.

A confirmação da presença dos terpenos deu-se por CG-EM. O cromatograma (Figura 44) indicou tempos de retenção de 20,653 min para β -amirina, 20,672 para α -amirina e 21,750 min para o lupeol, demonstrando uma similaridade na faixa de 90% entre os compostos identificados experimentalmente e a biblioteca do equipamento utilizado.

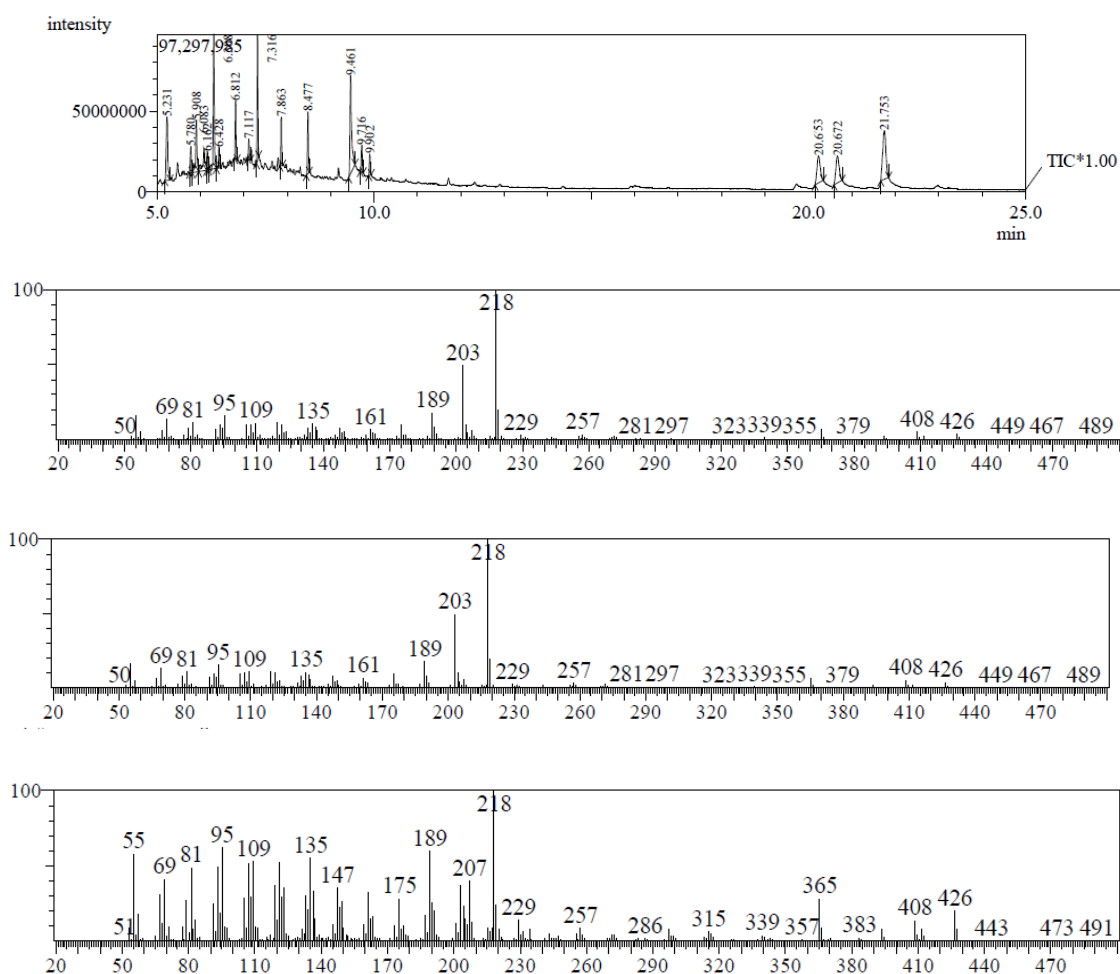


Figura 44. Cromatograma da subfração W9FH5.5.1 e espectros de massas da α -amirina, β -amirina e lupeol, respectivamente.

Nos espectros de massas (Figura 44), os picos m/z 426, correspondentes aos íons moleculares dos compostos (ZANON, PEREIRA, BOSCHETTI *et al*, 2008, MATOS 2011), confirmaram a existência dos mesmos na amostra.

Na subfração W9FH5.3.2 também foi identificada a estrutura da β -amirina. O cromatograma obtido por CG-EM (Figura 45) exibiu um tempo de retenção para o metabólito de 20,819 minutos, com similaridade de 94% entre o resultado experimental e a biblioteca do equipamento utilizado. O espectro de massas, por sua vez, demonstrou o pico do íon molecular do composto ($m/z = 426$).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 46), a existência do sinal em δ_{H} 5,17 ppm (t , $J = 3,5$ Hz) possibilitou verificar a presença do metabólito de forma minoritária em meio a mistura.

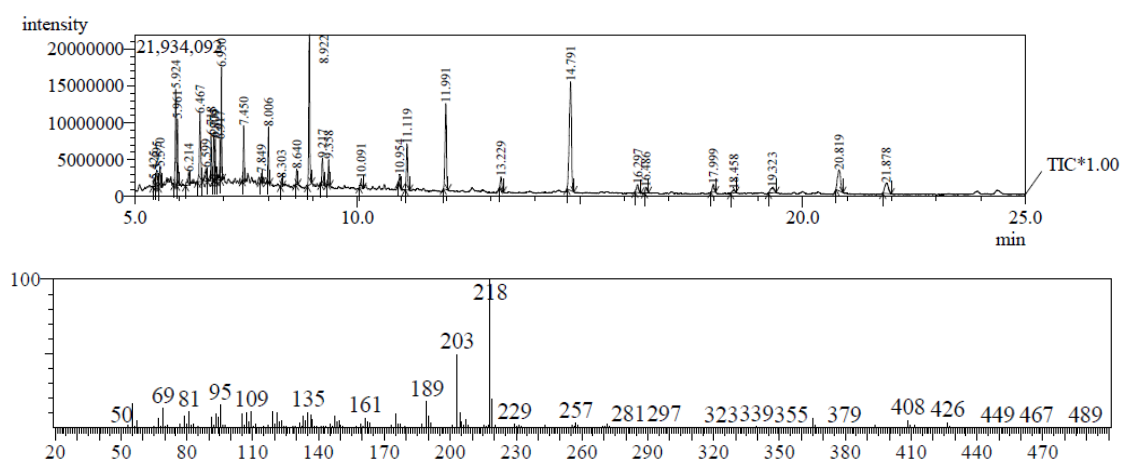


Figura 45. Cromatograma da subfração W9FH5.3.2 e espectro de massas da β -amirina.

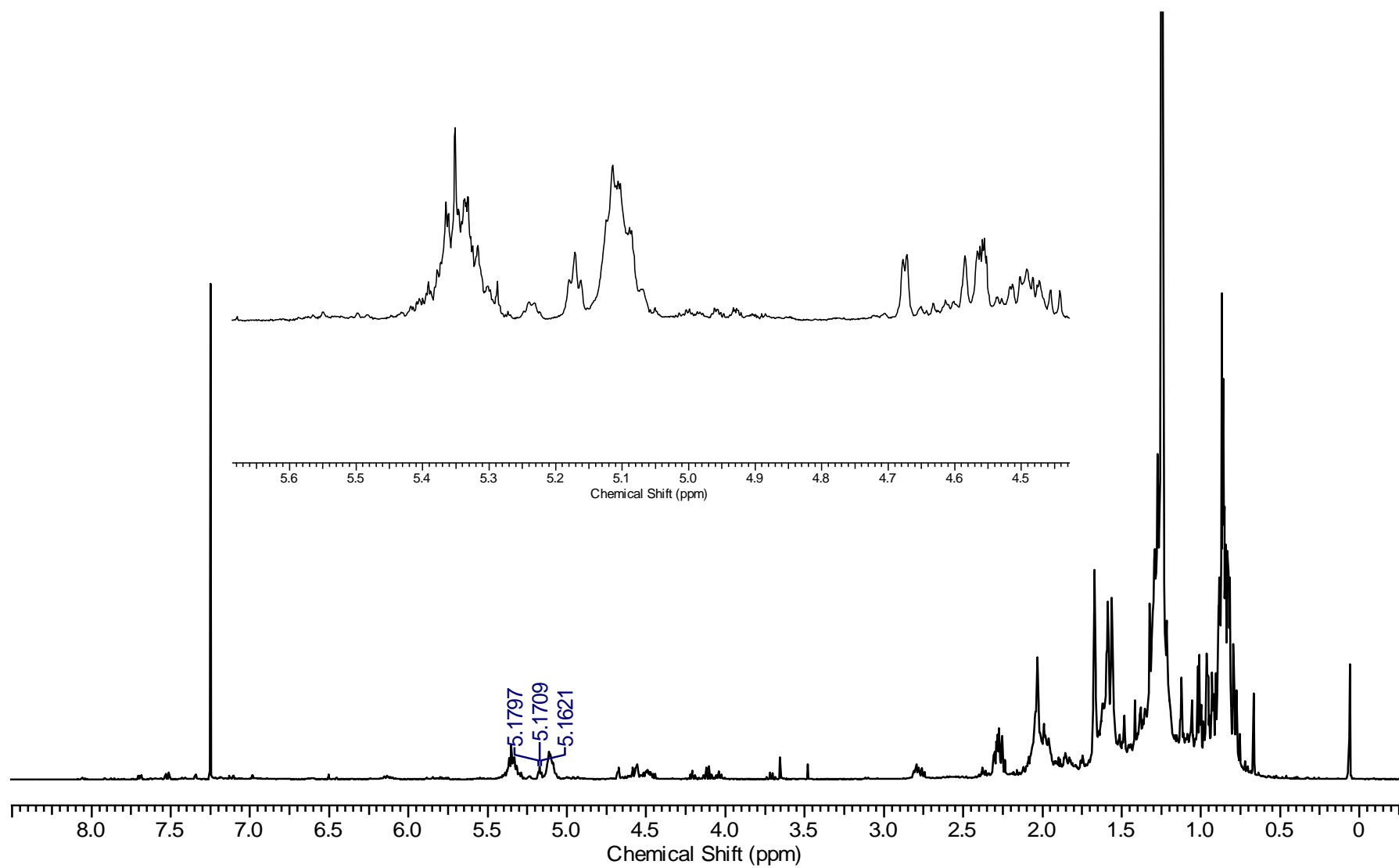


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H para β -amirina (CDCl_3 , 400 MHz).

Os terpenos constituem, portanto, o grupo mais complexo e diversificado de metabólitos secundários e o segundo maior em termos de relevância farmacológica (FELIU, 2011). Tais compostos manifestam grande utilidade no tratamento de várias doenças, por possuírem propriedades anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antialérgica, anti-espasmódica, anti-inflamatória, imunomoduladora, dentre outras (PADUCH, SZERSZEN, TRYTEK, 2007). Podem também atuar como inseticidas naturais e protetores que aumentam o tempo de armazenagem de produtos agrícolas (FELIU, 2011, PADUCH, SZERSZEN, TRYTEK, 2007).

Especificamente, alguns triterpenos possuem atividades fisiológicas bastante estudadas. A α -amirina e β -amirina, por exemplo, ostentam ações anticonvulsivante, antidepressiva, ansiolítica e sedativa (FELIU, 2011).

4.7.5 Substância 8

Identificado também de forma minoritária e em mistura a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico, o composto **8** foi definido como sitosterol (Figura 47) por meio do RMN de ^1H , CG-EM e comparação com a literatura (ZANON, PEREIRA, BOSCHETTI *et al*, 2008, SANTOS, OLIVEIRA, VARELLA *et al*, 2010).

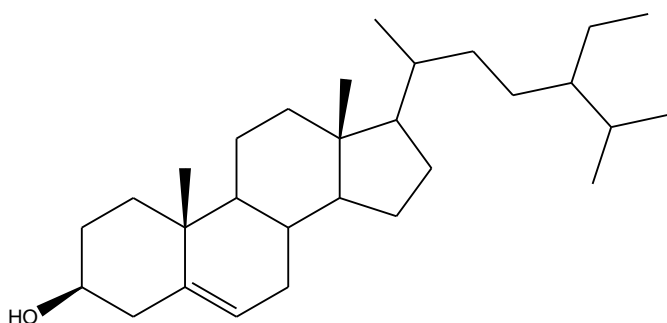


Figura 47. Estrutura química do sitosterol (**8**).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 48), o sinal em δ_{H} 5,34 ppm (d, $J = 5,4$ Hz), relacionou-se ao hidrogênio olefínico da estrutura, enquanto o sinal na região de δ_{H} 3,50 ppm (m), correspondeu ao sinal típico de seu átomo de hidrogênio oximetínico.

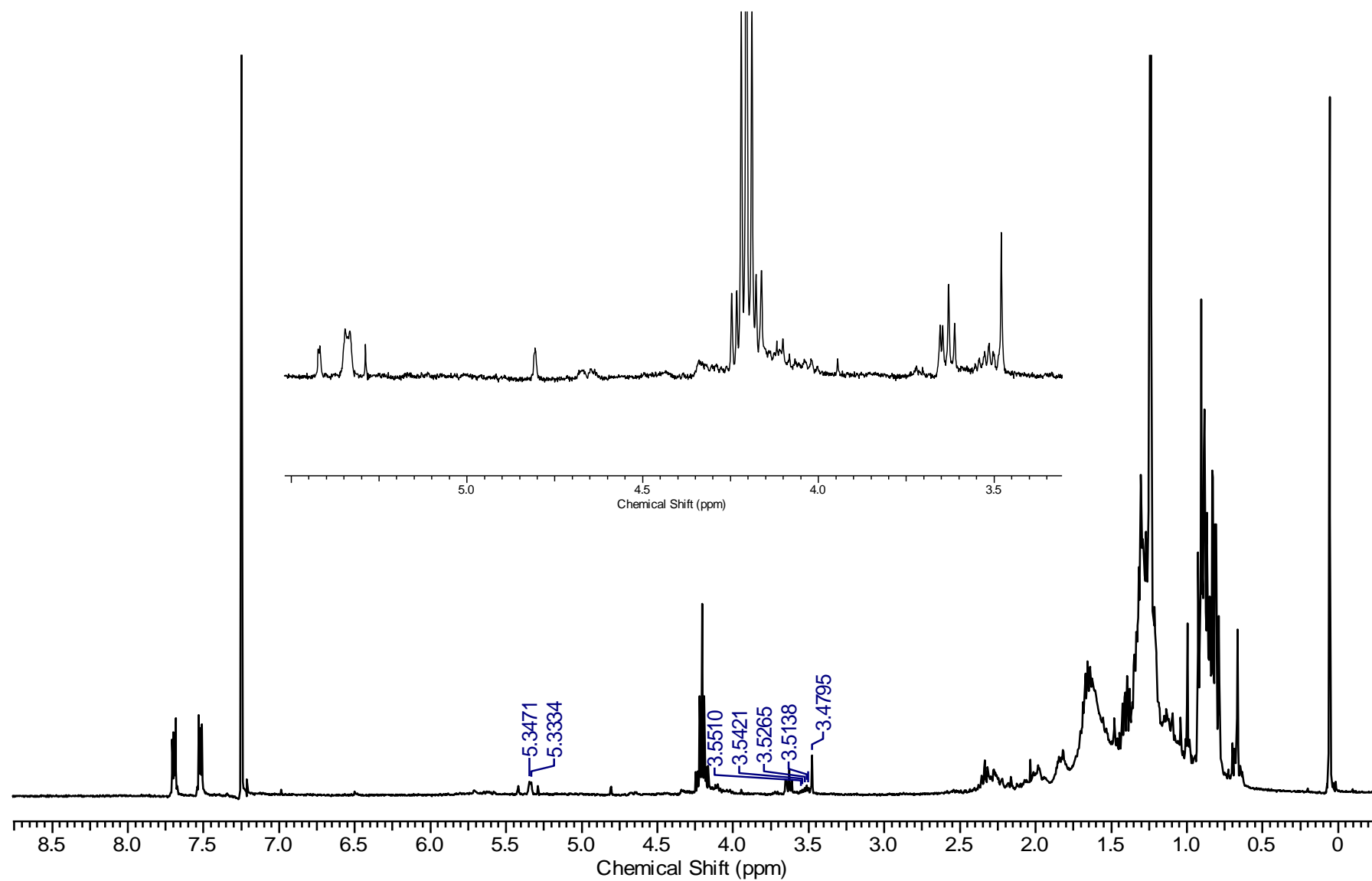


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H para o sitosterol (CDCl_3 , 400 MHz).

A confirmação da presença do sitosterol deu-se pelo cromatograma obtido por CG-EM (Figura 49), o qual exibiu tempo de retenção para a molécula de 29,917 min e similaridade de 91% entre o composto identificado experimentalmente e a biblioteca do equipamento.

Já o espectro de massas apresentou o pico m/z 414 correspondente ao íon molecular do metabólito (SANTOS, OLIVEIRA, VARELLA *et al*, 2010) (Figura 49).

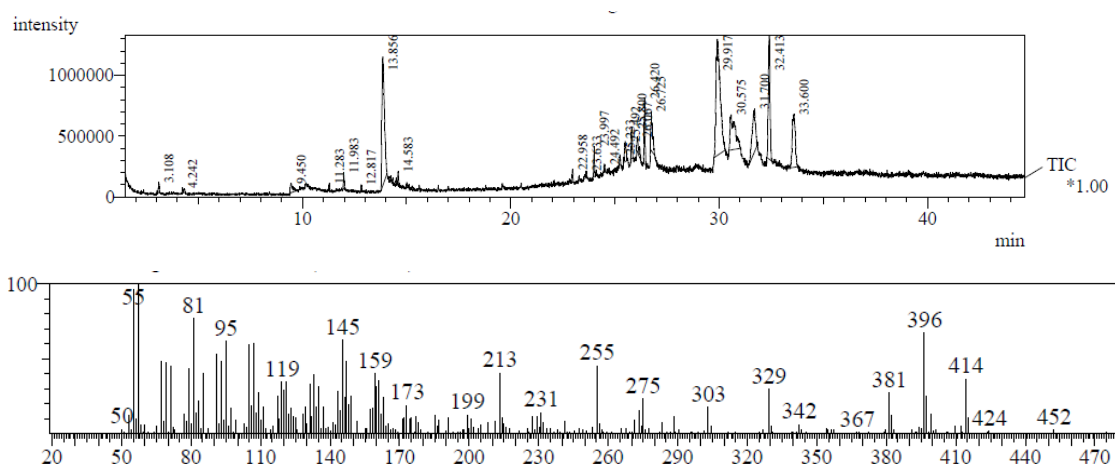


Figura 49. Cromatograma da subfração W9FH5.6.2 e espectro de massas do sitosterol.

Os esteroides tratam-se de triterpenos modificados contendo um sistema tetracíclico em sua estrutura. Especificamente, os fitoesteroides diferem das estruturas encontradas em outros tipos de organismos por apresentarem grupamentos álcool livres ou ainda por estarem associados a ácidos graxos. São formados por 28 ou 29 carbonos e agrupam-se em mais de 40 tipos de esqueletos diferentes, sendo o sitosterol, estigmasterol (**IX**) e campesterol (**X**) os mais presentes em plantas (Figura 50) (DEWICK, 2002, FELIU, 2011).

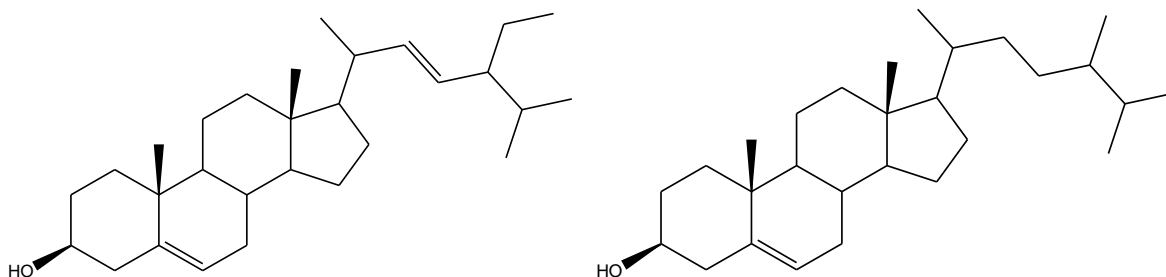


Figura 50. Estruturas químicas do estigmasterol (**IX**) e campesterol (**X**), respectivamente.

O sitosterol é o fitoesteroide com 29 carbonos mais abundante no reino vegetal, estando igualmente muito difundido em espécies da família Euphorbiaceae

(CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2003, ZHAO, WOLFENDER, MAVI *et al*, 1998). É também considerado um dos mais importantes em termos medicinais, exibindo atividades hipocolesterolêmica, antioxidante e anticâncer (FELIU, 2011).

4.8 Avaliação das substâncias isoladas no teste de inibição de catepsinas

Todas as quatro substâncias isoladas foram ensaiadas frente às catepsinas K, L e V, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ (%).

Tanto loliolida, ácido gálico, galato de etila e protocatecuato de metila exibiram porcentagem de inibição igual à zero para todas as enzimas do teste, demonstrando que, provavelmente, a ação contra essas catepsinas, exibida principalmente pela fração acetato de etila, deve-se a substâncias não isoladas neste trabalho.

4.9 Considerações sobre o ensaio das substâncias isoladas frente a células tumorais

Apesar de o extrato bruto não ter apresentado uma viabilidade celular menor que 50% no ensaio, sabe-se que ensaios biológicos utilizando extratos brutos são mais aplicados como forma de triagem e não estão livres de gerar resultados falso-negativos/positivos. Ao mesmo tempo, a família Euphorbiaceae ostenta diversos metabólitos secundários isolados os quais exibem potencial atividade anticancerígena. A espécie *Croton cajucara*, por exemplo, e como já descrito, é fonte da substância *trans*-desidrocrotonina (*trans*-DCTN) com comprovada ação nesse aspecto (COSTA, MAGALHÃES, GOMES *et al*, 2007) e alvo de vários estudos farmacêuticos no intuito de sua aplicação terapêutica.

Adicionalmente, algumas das próprias substâncias aqui isoladas, como a loliolida e o galato de etila, foram relatadas, em outros trabalhos, apresentando atividade citotóxica (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al*, 2002, KALAIVANI, RAJASEKARAN e MATHEW, 2011) perante células tumorais. Todavia, a pequena quantidade de massa obtida no isolamento inviabilizou o teste com essas substâncias.

5. CONCLUSÃO

O estudo químico das folhas de *Pachystroma longifolium* levou ao isolamento da loliolida, uma lactona terpênica, e de três compostos fenólicos: ácido gálico, galato de etila e protocatecuato de metila. Adicionalmente, foram identificados os triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol, e o esteroide sistosterol.

Visto que essa espécie, e também o próprio gênero, não apresentam nenhum estudo químico e/ou biológico até agora publicado, as informações aqui obtidas contribuem de forma essencial para iniciar o maior conhecimento de ambos. Sabendo-se que a família Euphorbiaceae ostenta uma ampla variedade química e diversas ações biológicas relatadas, inclusive de relação com a medicina popular, considera-se que a espécie *P. longifolium* pode ainda apresentar muitos constituintes interessantes em tais pontos de vista.

Apesar de as substâncias isoladas não terem manifestado resultados positivos quando ensaiadas, a ação inibidora de catepsina V apresentada, principalmente pela fração acetato de etila, é passível de destaque. Visto essas enzimas serem atualmente relatadas como interessantes alvos terapêuticos, pelo fato de estarem envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, tem-se, neste ponto, um potencial caminho para continuação dos estudos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; FARRUKH, A.; MOHAMMAD, O.. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants Into Drugs. Wiley-VCH, 2006. 136p.
- ALCALÁ, M.. Estrutura Populacional de *Pachystroma longifolium*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2010. 53 p.
- ANJOS, A.C.Y.; ZAGO, M.M.F.. A experiência oncológica na visão do paciente. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, **14(1)**, 33-40, 2006.
- AZIZUDDIN; MAKHMOOR, CHOUDHARY, M.I.. Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*. *Turk J. Chem.*, **34**, 119-126, 2010.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S.. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, **32(3)**, 679-688, 2009.
- BENNANI, Y.L.. Drug Discovery in the next decade: innovation needed ASAP. *Drug Discovery Today*, **16 (17)**, 779-792, 2011.
- BLOOMQUIT, M.G.. Nutrient deficiencies. 2004. Disponível em: www.certifiedorganic.bc.ca. Acessado em 07 de julho de 2013.
- BUTCHART, S.H.M.; WALPOLE, M.; COLLEN, B.; van STRIEN, A.; SCHARLEMANN, J.P.W; ALMOND, R.E.A. *et al.* Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science*, **328**, 1164-1168, 2010.
- CARDOSO-LOPES, E.M.; PAULA, D.M.B.; BARBO, F.E.; SOUZA, A.; BLATT, C.T.T.; TORRES, L.M.B.; YOUNG, M..C.M.. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae).
- CHATIRVEDULA, V.S.P.; ZHOU, B.N.; GAO, Z.; THOMAS, S.J.; HECHT, S.M.; KINGSTON, D.G.I.. New lupine triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β . *Bioorg, Med, Chem*, **12**, 6271-6275, 2004.
- CHATTERJEE, A.; CHATTERJEE, S.; BISWAS, A.; BHATTACHARYA, S.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, K.. Gallic acid enriched fraction of *Phyllanthus emblica* potentiates indomethacin-induced gastric ulcer healing via e-

NOS-dependent pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

CHENG, H.L.; ZHANG, L.J.; LIANG, Y.H.; HSU, Y.W.; LEE, I.J.; LIAW, C.C.; HWANG, S.Y.; KUO, Y.H.. Antiinflammatory and antioxidant flavonoids and phenols from *Cardiospermum halicacabum*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **3**, 33-40, 2013.

COHEN, H.; CHARRIER, C.; SARFATY, J.. Extraction and identification of a plasticizer, di-(2-ethylhexyl)phthalate, from plastic bag containing contaminated corn. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**, 437-440, 1991.

CONEGERO, L.S.; IDE, R.M.; NAZARI, A.S.; SARRAGIOTTO, M.H.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A.. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Quim. Nova*, **26(6)**, 825-827, 2003.

COOPER, E.L.; YAO, D.. Diving for drugs: tunicate anticancer compounds. *Drug Discovery Today*, **17(11)**, 636-648, 2012.

COPELAND, R.A.. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. John Wiley e Sons, New Jersey, 2005, 294p.

Conservation International. Disponível:
http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/Pages/hotspots_main.aspx.
 x. Acessado em 06 de abril de 2013.

COSTA, M.P.; MAGALHÃES, N.S.S.; GOMES, F.E.S.; MACIEL, M.A.M.. Uma revisão das atividades biológicas da *trans*-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Ver. Bras. Farmacogn.*, **17(2)**, 275-286, 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, **2** (1), 47-48, 2010.

DE PAUW, B.. Is there a need for new antifungal agents? *Clinical Microbiology and*

Infection, **6** (2), 23-28, 2000.

DEWICK, P. M.; Medicinal natural products: a biosynthetic approach – 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, England, 2002. 515 p.

EGER, I.. Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanossoma cruzi*: avaliação in vitro e in vivo. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. 127p.

Euphorbiaceae. Disponível em:
<http://www.britannica.com.ez43.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/195411/Euphorbiaceae>.

ESTEVES, A.A.; BORGES, S.V., ABRANTES, S.; SILVEIRA, M.G.; SOUZA, M.O.C.C.. Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. *Quim. Nova*, **30**(1), 219-223, 2007.

FATORUSSO, E; TAGLIATELA-SCAFATI, O.. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. Wiley-VCH, 2008.

FELIU, D.A.. Análise de terpenóides de espécies de Croton sect Lamprocroton (Mull.Arg.) Pax (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, 2011. 117p.

FRANÇA, J.E.; FERNANDES, E.A.N.; BACCHI, M.A.; TAGLIAFERRO, F.S.. Pathway of rare-earth elements in a Brazilian forestry fragment. *Journal of Alloys and Compounds*, **344**, 21-26, 2002.

FREITAS, C.B.D.. Bioética e pesquisa com novos medicamentos. *Com. Ciências Saúde*, **20**(1), 75-78, 2009.

GAGNE, J.J.; CHOUDHRY, N.K.. How many “me-too” drugs is too many? *JAMA*. **305**, 711–721, 2011.

HANAZAKI, n.; TAMASHIRO, J.Y.; LEITÃO-FILHO, H.F.; BEGOSSI, A.. Diversity of plant uses in two caiçara communities from the Atlantic Forest coast, Brazil. *Biodiver*.

Conserv., **9**, 597-615, 2000.

HARVEY, L. A.. Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. *Drug Discovery Today*, **5**, 294-300, 2000.

HARVEY, L.A.. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **13 (19/20)**, 894-901, 2008.

HODGES, R.; PORTE, A.L.. The structure of loliolide. *Tetrahedron*, **20**, 1463-1467, 1964.

HONG, Y.H.; WANG, S.C.; HSU, C.; LIN, B.F.; KUO, Y.H.; HUANG, C.J.. Phytoestrogenic compounds in alfafa sprout (*Medicago sativa*) betond coumestrol. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 131-137, 2011.

HORA, R.C.; SOARES, J.J.. Estrutura fitossociológica da comunidade de lianas em uma floresta estacional semidecidual na Fazenda Canchim, São Carlos, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, **25**, 323-329, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. EdUFSCar, São Carlos, Brasil, 2003. 152 p.

HYOGO, A.; KOBAYASHI, T.; SAZ, E.G.; SEGUCHI, H.. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid, Ferulic Acid, and Caffeic Acid in Human Neutrophils Using a Fluorescent substance. *Int. J. Morphol.*, **28(3)**, 911-920, 2010.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D.. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **61(2)**, 69-90, 2011.

KALAIVANI, T.; RAJASEKARAN, C.; MATHEW, L.. Free radical scavenging, cytotoxic and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.). *J. Food Sci.*, **76(6)**, 2011.

KIM, M.R.; LEE, S.K.; KIM, C.S.; MOON, D.C.. Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* Fr. et Sav. *Arch. Pharm. Res.*, **27(10)**, 1029-1033, 2004.

KIMURA, J.; MAKI, N.. New loliolide derivatives from the Brown Alga *Undaria pinnatifida*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 57-58, 2002.

KISSIN, I.. An early indicator of drug success: Top Journal Selectivity Index. *Drug Design, Development and Therapy*, **7**, 93-98, 2013.

KOTHALE, K.V.; ROTHE, S.P.; PAWADE, P.N.. Phytochemical screening of some Euphorbiaceae members. *Journal of Phytology*, **3**(12), 60-62, 2011.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T.. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Revi. Drug Discovery*, **4**, 206-220, 2005.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S.. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathology – Research and Practice*, **204**, 491-500, 2008.

KUO, Y.H.; LO, J.M.; CHAN, Y.F.. Cytotoxic components from the leaves of *Schefflera taiwaniana*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **49**, 427-431, 2002.

LANKELMA, J.M.; VOOREND, D.M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; VAN DER SPEK, A.H.; DE PORTO, A.P.; VAN ROOIJEN, G.; VAN NOORDEN, C.J.. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.*, **86**, 225-233, 2010.

LETO, G.; SEPPORTA, M.V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C.; TUMMINELLO, F.M.. Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications. *Biol. Chem.*, **391**, 655-664, 2010.

LI, J.W.-H.; VEDERAS, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier. *Science*, **325**, 161-165, 2009.

LIMA, M.A.A.; LIMA, J.Q.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G.M.; BEZERRA, B.P.; FERREIRA, Y.S.; VERAS, H.N.H.; BRAZ-FILHO, R.. Constituintes químicos de *Sebastiania macrocarpa* MUELL. ARG. (Euphorbiaceae). *Quim. Nova*, **32**(2), 348-353, 2009.

LINK, K.P.; ANGELL, H.R.; WALKER, J.C.. The isolation of protocathechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *J. Biol. Chem.*, **81**, 369-375, 1929.

LORENZI, H.. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.

4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 640p.

LOUNIS, N.; VEZIRIS, N.; Chauffor A e cols. Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potencial to shorten treatment duration. *Antimicrob Agents Chemoter*, **Nov**, 3543-47, 2006.

LUO, W.; ZHAO, M.; YANG, B.; REN, J.; SHEN, G.; RAO, G.. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, **126**, 277-282, 2011.

MA, X.; WANG, Z.. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, **14(23/24)**, 1136-1142, 2009.

MARQUES, E.F.. Estudos de produtos naturais e derivados sintéticos buscando inibidores seletivos das catepsinas L e V. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, 2011. 152 p.

MARQUES, E.F.; BUENO, A.M.; DUARTE, P.D.; SILVA, L.R.S.P.; MARTINELLI, A.M.; SANTOS, C.Y.; SEVERINO, R.P.; BROMME, D.; VIEIRA, P.C.; CORRÊA, A.G.. Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V. *Europ. J. Med. Chem.*, **54**, 10-21, 2012.

MATOS, L.M.M. Química de espécies nativas de Croton L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, 2011. 132 p.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F.. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Revi.Cancer*, **6**, 764-774, 2006.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y.; NISHIZAWA, Y.; TOKIMTSU, I.; KITA, T.. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1412-1420, 1999.

MWINE, J.T.; VAN DAMME, P.. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A Review of Euphorbiacear Family and Its Medicinal Features. *J. Med. Plant. Res*, **5(5)**, 652-662, 2011.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J.. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858, 2000.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; RASOOL, S.A.; AHMAD, S.; SAYEID. S.A.. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, **72(9)**, 341-345, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M.. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**, 311 – 335, 2012.

OCAMPO, R.; CALLOT, H.J.; ALBRECHT, P.; KINTZINGER, J.P.. A novel chlorophyll c related petroporphyrin in oil shale. *Tetrahedron Letters*, **25(24)**, 2589-2592, 1984.

OOSHIRO, A.; HIRADATE, S.; KAWANO, S.; TAKUSHI, T.; FUJII, Y.; NATSUME, M.; ABE, H.. Identification and activity of ethyl gallate as na antimicrobial compound produced by *Geranium carolinianum*. *Weed Biology and Management*, **9**, 169-172, 2009.

PADUCH, R.; SZERSZEN, M.K.; TRYTEK, M.. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **55**, 315-327, 2007.

PALATNICK, W.; TENENBEIN, M.. Hepatotocity from Castor Bean Ingestion in a Child. *Clin. Toxicol.*, **38**, 67-69, 2000.

PALERMO, C.; JOYCE, J.A.. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in câncer. *Cell press.*, **29**, 22:27, 2007.

PATERSON, I.; ANDERSON, E.A.. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. *Science*, **310**, 451-453, 2005.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R.. Introduction to Spectroscopy. Brooks/Cole, Belmont, 2009. 745p.

PERCOT, A.; YALCIN, A.; AYSEL, V.; ERDUGAN, H.; DURAL, B.; GUVEN, K.C.. Loliolide in marine algae. *Nat. Prod. Res.*, **23(5)**, 460-465, 2009.

PETTIT, G.R., HERALD, C.L., ODE, R.H., BROWN, P., GUST, D.J. & MICHEL, C..

The isolation of loliolide from an Indian ocean opisthobranch mollusc. *J. Nat. Prod.*, **43**, 752-755, 1980.

PINHO, E.I.B.; RIBEIRO, D.R.; RABELO, G.R.; FREITAS, A.V.; SILVA, M.V.A; CUNHA, M; VITÓRIA, A.P.. Resposta fotoquímica da secundária tardia *Pachystroma longifolium* (Ness) I.M. Jonhst. Em função do tempo de abertura de clareiras na estação ecológica de Guaxindiba, RJ. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, São Lourenço, MG, 2009.

QUEIROZ, M. A. L. de; VASCONCELOS, F. C. de. Inovação e imitação na indústria farmacêutica: estratégias empresariais a partir da regulamentação dos medicamentos genéricos. *REBRAE*, **1** (1), 107-108, 2008.

RABELO, G.R.; MARQUES, J.B.C.; ZOTTICH, U.; DIAS, G.B.; MIGUEL, E.C.; GOMES, V.M.; DA CUNHA, M.. Leaf structure, microanalysis and characterization of the latex protein profile of *Pachystroma longifolium* (Nees) I.M.Jonhst. (Euphorbiaceae) in a seasonally dry Atlantic Forest. *Acta Bot. Bras.*, **25(1)**, 150-159, 2011.

RATES, S.M.K.. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-611, 2001.

REFAHY, L.A.G.. Study on flavonoids and triterpenoids content of some Euphorbiaceae plants. *J. Life. Scienc.*, **5**, 100-107, 2011.

REJÓN, G.E.; RODRÍGUEZ, L.M.P.; STERNER, O.. Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*. *J. Mex. Chem. Soc.*, **53(2)**, 44-47, 2009.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J; HIROTA, M.M.. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1141-1153, 2009.

RUDIYANSYAH; GARSON, M.J.. Secondary metabolites from the wood bark of *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis*. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1218-1221, 2006.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G.. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Cronton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical*

Society, **18(1)**, 11-33, 2007.

SANAE, F.; MIYAICHI, Y.; HAYASHI, H.. Potentiation of vasoconstrictor response and inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by gallic acid in rat aorta. *Planta Med.*, **68(8)**, 690-693, 2002.

SANTANA, J.S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G.; MATSUO, A.L.. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova*, **35(11)**, 2012.

SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, C.A.N.; VARELLA, L.; MATOS, A.P.; TEREZAN, A.P.; LEITE, A.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; PIRANI, J.R.. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). *Quim. Nova*, **33(10)**, 2080-2082, 2010.

SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N.. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, **22(1)**, 99-118, 2008.

SEVERINO, R.P.. Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, 2008. 248 p.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C.. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, **24(4)**, 649-656, 2006.

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P.. Farmacognosia Coletânea Científica. Ed. UFOP, Ouro Preto, 2012. 376p.

SOUZA, R.P.; VÁLIO, I.F.M.. Seed size, seed germination, and seedling survival of Brazilian tropical tree species differing in successional status. *Biotropica*, **33(3)**, 227-457, 2001.

STASI, L.C.D.; HIRUMA-LIMA, C.A.. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª Ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002. 592p.

STREIT N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H.. The chlorophylls. *Cienc. Rural*, **35(3)**, 748-755, 2005

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C.. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, **1(1)**, 132-138, 2005.

TANAKA, T.; TANAKA, T.; TANAKA, M.. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, **3(1)**, 27-33, 2011.

TURK, D.; GUNCAR, G.. Lysosomal cysteine prootease (cathepsinas): promising drug targets. *Acta Crys*, **D59**, 203-213, 2003.

VON ELBE, J.H.. Colorantes. Química de los alientos. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000. 799 p.

YANG, X.; KANG, M.C.; LEE, K.W.; KANG, S.M.; LEE, W.W.; JEON, Y.J.. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum*. *Algae*, **26(2)**, 201-208, 2011.

YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGBO, M.; WEBER, E.; BROMME, D.. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J. Biol. Chem.*, **279**, 761-770, 2004.

ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F.; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18(2)**, 226-229, 2008.

ZHAO, W.; WOLFENDER, J.L.; MAVI, S.; HOSTETTMAN, K.. Diterpenes and sterol frol neoboutonia melleri. *Phytochemistry*, **48(7)**, 1173-1177, 1998.